

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle**  
Bureau international



**(43) Date de la publication internationale**  
**27 février 2003 (27.02.2003)**

**PCT**

**(10) Numéro de publication internationale**  
**WO 03/016563 A2**

**(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12Q 1/68,**  
A61K 31/708, 31/519, 31/437, A61P 25/28, 9/10, 37/00

**(74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Cabinet Becker  
et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).**

**(21) Numéro de la demande internationale :**  
PCT/FR02/02861

**(22) Date de dépôt international :** 13 août 2002 (13.08.2002)

**(25) Langue de dépôt :** français

**(26) Langue de publication :** français

**(30) Données relatives à la priorité :**  
01/10819 14 août 2001 (14.08.2001) FR

**(63) Apparenté(e) par continuation (CON) ou par continua-  
tion partielle (CIP) à une demande antérieure :**  
US 09/983,754 (CIP)  
Déposée le Non communiquée

**(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :** EX-  
ONHIT THERAPEUTICS SA [FR/FR]; 26, rue Brunel,  
F-75017 Paris (FR).

**(72) Inventeurs; et**  
**(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :** AÏT  
IKHLEF, Ali [FR/FR]; 1, rue de l'Eglise, 91940 Gometz  
Le Châtel (FR). RESINK, Annelies [NL/FR]; 48, rue  
Bobillot, F-75013 Paris (FR). SCHWEIGHOFER,  
Fabien [FR/FR]; 38, avenue Paul Déroulède, F-94300  
Vincennes (FR).

**(81) États désignés (national) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**(84) États désignés (régional) :** brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US  
seulement*

**Publiée :**

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport*

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*

---

**(54) Title:** NOVEL MOLECULAR TARGET FOR NEUROTOXICITY

**(54) Titre :** NOUVELLE CIBLE MOLECULAIRE DE LA NEUROTOXICITE

**WO 03/016563 A2**

**(57) Abstract:** The invention relates to the field of biology, genetics and medicine and to novel methods of detecting, characterising and/or treating (or managing) neurodegenerative pathologies, particularly amyotrophic lateral sclerosis. Said invention also relates to methods of identifying or screening active compounds in said pathologies. Moreover, the invention relates to compounds, genes, cells, plasmids or compositions that can be used to carry out the above-mentioned methods. In particular, the invention outlines the role of PDE4B in said pathologies and the use thereof as a therapeutic, diagnostic or experimental target.

**(57) Abrégé :** La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en oeuvre des méthodes ci-dessus. L'invention décrit notamment le rôle de PDE4B dans ces pathologies et son utilisation comme cible thérapeutique, diagnostique ou expérimentale.

Nouvelle Cible Moléculaire de la Neurotoxicité

La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus. L'invention découle notamment de l'identification du rôle de la phosphodiésterase 4B dans ces pathologies et décrit son utilisation comme cible ou marqueur thérapeutique, diagnostique ou expérimental de ces désordres.

De nombreuses pathologies neurodégénératives ont été décrites comme ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'excitotoxicité. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques et de la chorée de Huntington.

La sclérose amyotrophique latérale (SAL ou ALS pour Amyotrophic Lateral Sclerosis) est une maladie neurodégénérative associée à différents types d'inclusions tels les corps de Lewy et caractérisée par une apoptose des motoneurones spinaux et corticaux dont l'issue fatale est parfois associée à une démence frontale. Des formes sporadiques, sans aucune mutation décrite, coexistent avec des formes familiales (FALS) associées à des mutations dans le gène SOD1 codant pour la superoxyde dismutase. La majorité des cas est sporadique, les formes familiales (FALS) étant très rares. Il est vraisemblable qu'une longue période asymptomatique précède l'apparition des symptômes cliniques qui sont variés et dont la classification est complexe. Les futurs développements thérapeutiques substitueront aux traitements de la symptomatologie des stratégies basées sur les causes moléculaires de la pathologie. Au niveau cellulaire, ces symptômes sont associés à une mort des

motoneurones corticaux et des motoneurones spinaux. Cette mort neuronale a été reliée à différents phénomènes qui constituent la base de plusieurs pathologies neurodégénératives. C'est le cas de l'excitotoxicité liée au glutamate, du stress oxydatif, d'une certaine auto immunité dirigée contre des 5 marqueurs neuronaux (les canaux calciques dans le cas de l'ALS) ainsi que d'anomalies du cytosquelette. Si ces phénomènes sont décrits, la ou les causes de ces maladies, dont l'ALS, sont obscures. Même si les FALS sont liées à des mutations dans le gène SOD1 qui code pour la superoxyde dismutase, les mécanismes qui engagent les neurones vers la mort cellulaire dont au moins 10 une composante est l'apoptose, sont inconnus.

L'identification des évènements moléculaires impliqués dans les différents phénomènes impliqués dans la mort cellulaire permettra de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'étude de ces évènements est difficilement réalisable à partir de biopsies humaines. Ces biopsies proviennent évidemment d'échantillons post-mortem dont la qualité est difficilement contrôlable et ne représentent que des états pathologiques représentatifs des 15 phases tardives de la maladie.

20 Les modèles animaux donnent accès à des échantillons biologiques qui permettent d'analyser différentes étapes du développement d'une pathologie et de comparer ces étapes à des témoins sains. A cet égard, des souris transgéniques qui expriment le gène humain SOD1 portant l'une des mutations qui prévaut dans les FALS (mutation G93A) sont disponibles auprès de Jackson 25 Laboratory, sous condition de prise d'une licence d'utilisation auprès de la NorthWestern University. Ce modèle reproduit en 120 jours l'issue fatale de la maladie avec des symptômes comparables à ceux de la maladie humaine. L'apparition des symptômes d'ALS liés à la mutation G93A dans SOD1 n'est 30 pas la conséquence d'une réduction de l'activité superoxyde dismutase mais d'un gain de fonction qui augmente la capacité de l'enzyme à générer des radicaux libres. Malgré ces informations, les évènements moléculaires qui président aux différentes étapes de l'ALS sont mal connus. La complexité de

ces évènements moléculaires reflète l'évolution de la pathologie : Dans le modèle transgénique étudié, aucune dérégulation neuronale ou manifestation clinique n'a été rapportée à 30 jours. 60 jours correspondent à un stade qui précède de peu les premiers symptômes, mais qui est déjà caractérisé au 5 niveau cérébral par des changements dans la physiologie cellulaire tels qu'une altération du métabolisme mitochondrial, un stress et une mort neuronale associés à un phénomène d'excitotoxicité. A 90 jours, 50% des motoneurones corticaux et spinaux sont morts et un processus actif d'apoptose neuronale est engagé parallèlement à une activation astrocytaire. Le phénomène 10 d'excitotoxicité n'est plus observé à ce stade. La mort neuronale y est associée à l'activation de caspases qui ne semblent pas impliquées dans les phases précoce de la pathologie.

Identifier les différents évènements moléculaires spécifiques des différentes 15 phases de la pathologie doit permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques aussi bien que de nouveaux marqueurs diagnostiques. L'une des approches les plus efficaces pour réaliser cette identification consiste à identifier les gènes et les protéines dont l'expression caractérise un état physiopathologique.

20 La présente invention décrit à présent l'identification d'événements génétiques impliqués dans les phénomène d'excitotoxicité et de mort neuronale. La présente invention fournit ainsi de nouvelles approches thérapeutiques et diagnostiques des pathologies associées à ces phénomènes, ainsi que de 25 nouvelles cibles pour l'identification de composés actifs.

Plus particulièrement, une analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN extraits d'échantillons de cerveau et de moelle épinière, sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum 30 d'évènements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie. Cette analyse a été effectuée par criblage différentiel qualitatif selon la

technique DATAS (décrite dans la demande n° WO99/46403), qui présente des avantages inégalés.

La présente demande de brevet découle notamment de la construction par la demanderesse d'un répertoire des altérations d'épissage dans le cerveau des animaux modèles de l'ALS âgés de 60 jours. Ce répertoire, qui contient plus de 200 séquences distinctes, implique des acteurs clefs du phénomène d'excitotoxicité tels que les canaux potassiques et le récepteur NMDA. Des séquences dérivées d'ARNs codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress, dont des protéines de choc thermique, font également partie de ce répertoire, soulignant l'implication de cette réponse dans les phases précoces de l'ALS. Une altération du métabolisme énergétique apparaît clairement affecter les motoneurones corticaux des animaux qui développent la pathologie. Par exemple, l'intron 6 de la forme mitochondriale de la créatine kinase est isolé spécifiquement à partir des ARN messagers exprimés en conditions pathologiques chez les animaux âgés de 60 jours. Cette interruption de la séquence codante par cette rétention d'intron aboutit à un ARN messager qui code pour une forme inactive de l'enzyme. Cette observation est en accord avec les observations biochimiques qui ont montré une diminution de l'activité créatine kinase mitochondriale corrélée avec une diminution de la quantité de cette enzyme dans les neurones des animaux du même modèle transgénique. La spécificité des séquences qui constituent ce répertoire est attestée par le fait que la même analyse différentielle qualitative de l'expression génétique réalisée sur des animaux âgés de 90 jours aboutit à un répertoire différent dont sont absents notamment les différents marqueurs de l'excitotoxicité. L'analyse des modifications d'épissage confirme que les événements moléculaires sont différents selon le stade de la pathologie.

De manière particulièrement intéressante et inattendue, la réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques âgés de 60 jours a permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de la phosphodiesterase 4B. Ce fragment correspond à un fragment d'exon spécifiquement présent dans les

animaux contrôles et donc spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce fragment recouvre les nucléotides 377 à 486 référencés à partir du codon stop de la PDE4B de souris (SEQ ID NO :1) (séquence également accessible dans GenBank, n°AF208023).  
5 Cette séquence comprend 2912 bases, le fragment délété correspondant aux bases 2760 à 2869. Cette région est non codante et est exprimée différentiellement entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques, du fait de l'utilisation alternative d'un exon 3' non codant ou du fait de l'utilisation de deux sites de polyadénylation alternatifs. Cette expression différentielle a été mise en évidence par des expériences de RT PCR présentées sur les figures 10 1A et 1B.

La présente demande démontre donc l'implication de la phosphodiesterase 4B dans le développement des processus d'excitotoxicité et de mort neuronale. Les 15 résultats obtenus montrent une expression plus prononcée de PDE4B dans les tissus nerveux pathologiques, liée à une modification structurale de l'ARN correspondant, notamment à la délétion d'une région dans la partie 3' non-codante. Ce résultat est tout à fait compatible avec la présence de séquences de déstabilisation des ARNm dans la séquence identifiée par DATAS. Leur 20 délétion de l'ARNm de la PDE4B, par épissage ou par utilisation de séquences de polyadénylation alternatives, peut aboutir à une stabilisation, donc à une augmentation de l'expression de la partie codante de cet ARN. Cet événement se produit spécifiquement dans le cerveau des sujets pathologiques et non dans les sujets contrôles.  
25 La présente invention décrit donc un événement moléculaire original qui aboutit à une augmentation de l'expression de l'ARNm de la PDE4B dans le cerveau des sujets pathologiques et qui est corrélé dans le temps avec le phénomène d'excitotoxicité et/ou de mort neuronale. L'invention montre également, pour la première fois, qu'une augmentation de l'expression de la PDE4B est associée 30 aux stades précoces de l'ALS. La PDE4B constitue donc une cible thérapeutique nouvelle et importante dans le développement de thérapeutiques de ces pathologies, utilisables notamment à des phases précoces de leur

développement, et s'adressant aux véritables bases moléculaires de la pathologie et non aux symptômes ou composantes inflammatoires associées. L'invention décrit également de nouvelles méthodes de diagnostic, dépistage, détection, détermination d'une prédisposition ou de suivi de l'évolution ou de l'efficacité du traitement de ces pathologies.

### Détection, Diagnostic et dépistage

Un objet de l'invention réside donc dans une méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la mesure *in vitro* de l'expression de la phosphodiésterase 4, notamment de la phosphodiésterase 4B dans un échantillon provenant du sujet. La méthode comprend avantageusement une mesure de l'expression différentielle de la région 3' non-codante du gène PDE4B et du reste du gène, notamment de la partie codante.

Un autre objet de l'invention réside donc dans une méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la détection de la présence d'une forme mutée de l'ARN de la phosphodiésterase 4, notamment de la phosphodiésterase 4B dans un échantillon provenant du sujet, en particulier d'une forme délétée de tout ou partie de la région 3' non-codante.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un acide nucléique comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée du gène ou de l'ARN messager de la PDE4B pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou de détection d'une situation de stress neuronal et plus particulièrement la situation d'excitotoxicité.

L'invention réside, généralement, dans l'utilisation d'un acide nucléique complémentaire de tout ou partie du gène ou du messager de la PDE4B, pour la détection d'événements pathologiques de type excitotoxicité, stress ou mort

neuronale, etc. Plus généralement, l'invention repose sur une méthode de diagnostic, dépistage, caractérisation ou suivi d'une pathologie dégénérative, comprenant la mise en évidence d'une altération dans le gène PDE4 ou dans l'ARN correspondant, typiquement PDE4B.

5

L'expression de la PDE4, ou le différentiel d'expression, ou la présence d'une forme altérée peuvent être déterminés par des techniques conventionnelles de biologie moléculaire, comme par exemple par séquençage, hybridation, amplification, RT-PCR, migration sur gel, etc. L'invention est applicable au diagnostic ou la détection de différentes pathologies impliquant les phénomènes d'excitotoxicité, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques, l'ALS, la chorée de Huntington ou l'ischémie cérébrale. 10 Elle peut être utilisée pour la détection précoce, la mise en évidence d'une prédisposition, le choix et l'adaptation d'un traitement, le suivi de l'évolution de la pathologie, etc. Elle est particulièrement adaptée à la détection à un stade précoce de la sclérose en plaques ou de l'ALS. 15

Pour la mise en œuvre des méthodes génétiques de diagnostic ou de détection selon l'invention, on utilise plus particulièrement des acides nucléiques capables de mettre en évidence une forme délétée de l'ARNm de la PDE4B, notamment une forme dépourvue de tout ou partie de la région 3' non codante. A titre d'exemple spécifique, on utilise un acide nucléique complémentaire de tout ou partie de la région comprise entre les résidus 2760 à 2869 de la séquence SEQ 20 ID NO :1, ou des résidus correspondants de la séquence du gène ou de l'ARNm de la PDE4B humaine. La séquence de l'ADNc codant la PDE4B humaine et de la protéine correspondante sont représentées dans les séquences SEQ ID NO : 25 3 et 4 (voir également Genbank, n° NM\_002600). La région 3' non-codante de l'ARN ou du gène PDE4B humain correspond aux résidus 2461 à 4068 de SEQ ID NO :3.

30

Avantageusement, l'acide nucléique utilisé (comme sonde) comprend tout ou partie de la séquence codant la région 3' non-codante du gène ou de l'ARN de

la PDE4B comprise entre les nucléotides 2384 et 2869 de la séquence SEQ ID NO :1 ou entre les nucléotides 2461 et 4068 de la séquence SEQ ID NO :3 ou une séquence complémentaire de celles-ci.

5 Selon des modes particuliers de mise en œuvre, l'invention utilise un acide nucléique complémentaire d'une région comprise dans une séquence suivante :

- résidus 2384 à 2869 de SEQ ID n° 1
- résidus 2500 à 2869 de SEQ ID n° 1
- résidus 2760 à 2869 de SEQ ID n° 1

10 - résidus 2780 à 2850 de SEQ ID n° 1

- résidus 2790 à 2810 de SEQ ID n° 1
- résidus 2600 à 4040 de SEQ ID n° 3
- résidus 3000 à 4040 de SEQ ID n° 3
- résidus 3500 à 4040 de SEQ ID n° 3

15 - résidus 3900 à 4040 de SEQ ID n° 3.

Selon un autre mode particulier, on utilise un acide nucléique complémentaire de la séquence de la région de l'ARN de PDE4 résultant de la délétion de tout ou partie de la partie 3' non codante. L'élimination d'un domaine créé en effet de 20 nouvelles jonctions dans la séquence, qui sont spécifiques de la forme délétée et peuvent être utilisées pour mettre en évidence la présence d'une telle forme dans un échantillon.

La complémentarité entre la sonde et la séquence cible est, de préférence, 25 parfaite pour assurer une meilleure spécificité d'hybridation. Toutefois, il est entendu que certains mésappariements peuvent être tolérés. L'acide nucléique utilisé pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus peut être un ADN ou un ARN, de préférence un ADN d'origine synthétique. Il comporte de préférence de 30 10 à 500 bases, typiquement de 10 à 100 bases. Il est entendu qu'un acide nucléique plus long peut être utilisé, si désiré, bien que cela ne soit pas préféré. L'acide nucléique est avantagusement un ADN simple brin, de 10 à 500 bases, complémentaire d'une région au moins de la séquence 3'-non codante de la

PDE4B. L'acide nucléique peut être marqué, par exemple par voie radioactive, enzymatique, luminescente, fluorescente, chimique, etc.

Une autre approche pour détecter la présence d'une altération du gène PDE4  
5 utilise une amorce ou un couple d'amorces nucléiques permettant une amplification sélective d'une portion de l'ARN PDE4, de préférence comprenant une portion de la région 3' non codante. On utilise typiquement une amorce permettant l'amplification sélective de la forme altérée de l'ARN de PDE4, notamment d'une amorce spécifique de la jonction créée par l'élimination du  
10 partie de la région 3' de l'ARN.

A cet égard, un objet de l'invention réside dans une amorce complémentaire d'une partie de la région 3' non-codante de la PDE4B, et permettant l'amplification d'une partie de cette région. L'amorce comporte avantageusement de 8 à 20 bases. Elle est préférentiellement composée d'un fragment de 8 à 20 résidus consécutifs de la séquence comprise entre les nucléotides 2384 et 2869 de la séquence SEQ ID NO :1 ou entre les nucléotides 2461 et 4068 de la séquence SEQ ID NO :3 ou d'une séquence complémentaire de celles-ci. Un autre objet de l'invention réside dans un couple d'amorce permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région 3' non-codante de la PDE4, le dit couple comprenant au moins une amorce telle que définie ci-dessus.  
15  
20

Pour la mise en œuvre des méthodes selon l'invention, on met en contact in  
vitro un échantillon biologique d'un sujet, contenant un acide nucléique, avec un acide nucléique (sonde, amorce, etc.) tel que défini ci-dessus, et on détecte la formation d'un hybride ou d'un produit d'amplification. L'échantillon biologique peut être un échantillon de sang, de fluide, de cellule, de tissu, etc. L'acide nucléique peut être immobilisé sur un support, de type verre, silice, nylon, etc.  
25

30 Le procédé de détection, dépistage ou diagnostic peut être mis en œuvre à partir de différents types d'échantillons provenant d'un sujet, comme par

exemple des biopsies de tissus, notamment de tissu nerveux. De manière particulièrement surprenante et avantageuse, la présente invention montre par ailleurs que la dérégulation de l'expression de PDE4, corrélée au phénomène d'excitotoxicité, peut être mise en évidence directement dans le tissu musculaire. Ceci est tout particulièrement remarquable dans le cas de pathologies neurodégénératives telles que l'ALS.

Au cours du développement de l'ALS, les phénomènes dégénératifs se produisent non seulement dans le cerveau mais également dans la moelle épinière et en conséquence dans le muscle par défaut d'innervation. La figure 2 présente les modifications d'expression de l'ARNm de la PDE4B dans les muscles de souris contrôles et transgéniques, suivies en utilisant les mêmes amorces de PCR que lors de l'étude sur les ARN de cerveaux de ces mêmes animaux. De façon analogue, toutefois moins prononcée, une diminution de l'expression de la région 3' non codante de la PDE4B, et non du reste de cet ARNm (notamment la partie codante), est observée spécifiquement dans le muscle des animaux en fin de phase pré-symptomatique, c'est à dire âgés de 90 jours.

L'une des difficultés rencontrées lors des études et des traitements de l'ALS est la difficulté de poser un diagnostic précoce. Cette observation de dérégulation de l'ARNm de la PDE4B dans le muscle ALS permet de proposer un diagnostic précoce à partir de biopsies musculaires de patients. Ce diagnostic est basé sur la détection de l'expression différentielle de la région 3' non codante et du reste de la séquence, notamment codante, de la PDE4B.

25

Un procédé particulier de détection d'une situation de stress neuronal, notamment d'excitotoxicité, en particulier liée à une pathologie neurodégénérative chez un sujet, comprend la mesure de l'expression du gène PDE4B, ou de la présence de formes délétées du messager de PDE4B, dans un échantillon de cellules musculaires provenant dudit sujet.

Pour mesurer l'expression différentielle, on utilise par exemple une sonde correspondant à (c'est-à-dire spécifique de) une partie de la région 3' non codante et une sonde correspondant à une partie de la région codante de la PDE4B. Le signal détecté avec chacune de ces sondes permet d'évaluer le 5 différentiel d'expression. Une autre approche utilise deux couples d'amorces permettant une amplification d'une portion de la région 3' non codante d'une part et d'une partie de la région codante d'autre part.

Un autre objet réside dans un kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, 10 notamment de l'expression différentielle entre la région 3' non-codante et la région codante, le kit comprenant une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de la région 3' non-codante et une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de la région codante.

15 Un autre objet réside dans un kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, notamment de l'expression différentielle entre la région 3' non-codante et la région codante, le kit comprenant un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région 3' non-codante de la PDE4 et un couple d'amorces nucléotidiques permettant 20 l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région codante de la PDE4.

### Thérapie

Les phosphodiesterases hydrolysent les acides nucléiques cycliques tels l'AMPc 25 et le GMPc, régulant différentes cascades de signalisation. La PDE4B hydrolyse l'AMPc, régulant ainsi la concentration intracellulaire de ce second messager. L'implication de l'AMPc dans la balance qui existe entre la viabilité cellulaire et l'apoptose est bien décrite dans la littérature. Notamment, la cascade AMPc est bien intégrée dans les cascades de survie cellulaire impliquant des kinases 30 telles Akt et PI3K, de même que dans la régulation de l'activité du facteur de transcription CREB. Il est à noter que ce facteur de transcription est impliqué dans la survie neuronale et la croissance des neurites. Toutefois, l'utilisation

d'inhibiteurs de PDE et avantageusement de PDE4 n'a jamais été envisagée pour améliorer la viabilité neuronale et plus particulièrement leur protection contre l'excitotoxicité. Les inhibiteurs de PDE4, développés pour inhiber les phénomènes inflammatoires, ont été suggérés comme potentiellement utiles 5 dans des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Cette suggestion s'appuie sur la volonté de réduire les inflammations qui sont observées dans le cerveau au cours des processus neurodégénératifs et nullement sur un rationnel visant à inhiber directement la mort neuronale.

10 La présente invention montre l'existence d'événements d'épissage ou de sites de polyadénylation alternatifs affectant le gène de la PDE4, associés au développement de l'excitotoxicité neuronale, et fournit la base moléculaire qui justifie l'utilisation d'inhibiteurs de PDE4 pour le traitement de l'ALS et plus généralement pour améliorer la viabilité neuronale lors des phénomènes 15 d'excitotoxicité, en particulier dès les phases précoce de ces pathologies.

Un autre objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un composé capable d'inhiber ou de réduire l'expression ou l'activité de la PDE4B, pour la préparation d'une composition destinée au traitement des maladies 20 neurodégénératives, notamment en phase précoce, plus préférentiellement pour réduire l'excitotoxicité neuronale précoce associée aux maladies neurodégénératives telles l'ALS, Alzheimer ou Parkinson.

Un objet particulier réside dans l'utilisation d'un inhibiteur de PDE4 pour la 25 préparation d'une composition destinée au traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité chez les sujets atteints d'ALS ou pour augmenter la survie neuronale chez les sujets atteints d'ALS.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé capable 30 d'inhiber (de préférence de manière sélective) l'expression ou l'activité de la PDE4B de séquence SEQ ID n° 2 ou 4 pour la préparation d'une composition destinée à réduire l'excitotoxicité neuronale.

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de traitement d'une pathologie associée à un stress neuronal, notamment à une excitotoxicité, comprenant l'administration à un sujet d'un composé inhibiteur de l'activité ou de l'expression de la PDE4B, de préférence un composé inhibiteur sélectif de PDE4.

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de traitement de l'ALS, notamment dans une méthode pour augmenter la survie des neurones chez des patients atteints d'ALS, comprenant l'administration à un sujet d'un inhibiteur de PDE4, de préférence un composé inhibiteur sélectif de PDE4.

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, amélioration de la durée de vie, ralentissement de la progression de la maladie), etc. Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou traitements, notamment adressant les événements tardifs de la pathologie, tels que des inhibiteurs de caspases ou autres composés actifs.

Le composé utilisé peut être tout composé capable d'inhiber l'expression de la PDE4, notamment la PDE4B, c'est-à-dire en particulier tout composé inhibant la transcription du gène, la maturation des ARNs, la traduction de l'ARNm, la modification post-traductionnelle de la protéine, etc. Il peut s'agir d'un composé inhibant la modification de l'ARN, notamment la délétion d'une partie de la région 3' non-codante.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé est un acide nucléique anti-sens, capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou la traduction du messager correspondant. L'acide nucléique anti-sens peut comprendre tout ou partie de la séquence du gène de la PDE4B, d'un fragment de celle-ci, du messager de la PDE4B, ou d'une séquence complémentaire à celles-ci. L'antisens peut notamment comprendre une région complémentaire de la

séquence comprise entre les résidus 218-2383 de SEQ ID NO :1 ou 766-2460 de SEQ ID NO :3, et inhiber (ou réduire) sa traduction en protéine. L'antisens peut être un ADN, un ARN, un ribozyme, etc. Il peut être simple-brin ou double-brin. Il peut également s'agir d'un ARN codé par un gène antisens. S'agissant 5 d'un oligonucléotide antisens, il comprend typiquement moins de 100 bases, par exemple de l'ordre de 10 à 50 bases. Cet oligonucléotide peut être modifié pour améliorer sa stabilité, sa résistance aux nucléases, sa pénétration cellulaire, etc.

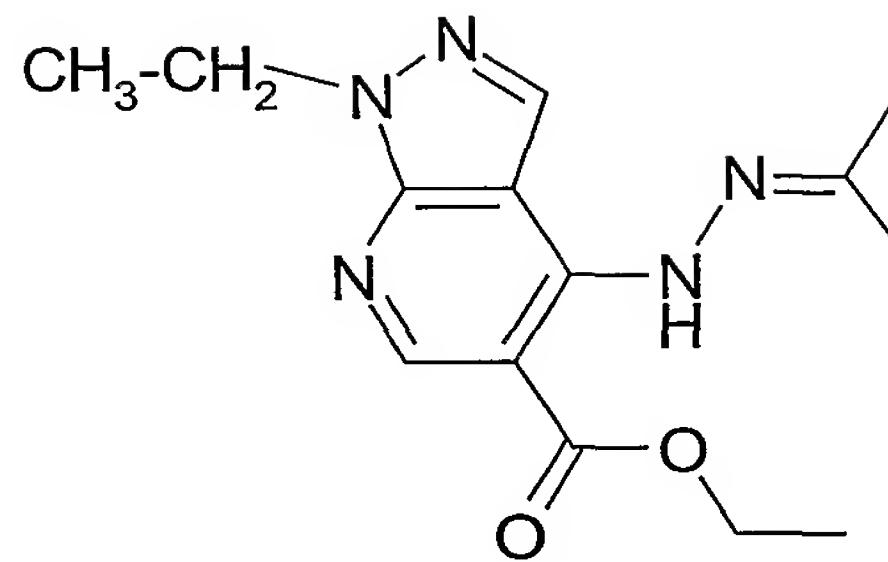
10 Selon un autre mode de réalisation, le composé est un peptide, par exemple comprenant une région de la protéine PDE4 (notamment PDE4B) et capable d'antagoniser son activité.

15 Selon un autre mode de réalisation, le composé est un composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique, notamment une molécule organique ou inorganique, d'origine végétale, bactérienne, virale, animale, eucaryote, synthétique ou semi-synthétique, capable de moduler l'expression ou l'activité de la PDE4B.

20 Dans une variante préférée, on utilise un composé de synthèse, inhibiteur de PDE4. Différents types d'inhibiteurs peuvent être mis en oeuvre. Il s'agit préférentiellement de composés de la famille des pyrazolopyridines, parmi lesquels figure notamment l'étazolate, ou de composés de la famille des dérivés de xanthine (ou 2,6-dioxopurine), parmi lesquels figure notamment la pentoxifylline.

25 Les composés de la famille des pyrazolopyridines sont en particulier choisis parmi les composés suivants :

L'étazolate de formule suivante :



Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (tracazolate),

5 Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique

10 1-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)- $\beta$ -D-1-deoxy-ribofuranose

15 Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-(N'-isopropylidene-hydrazino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (SQ 20009),

4-amino-6-methyl-1-n-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine

20 15 Ester éthylique de l'acide 4-Amino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (desbutyl tracacolate),

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

25 20 Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-methylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

Ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-propyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

30 25 Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-ethylamino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

35 30 5-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-2-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3-ol,

ester allylique de l'acide 1-allyl-4-amino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

40 35 acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-amino-1-ethyl-3,6-dimethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-dimethylamino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

5 ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

10 ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

15 4-amino-1-but-3-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-isopropylamide,

20 4-amino-1-pentyl-N-n-propyl-1*H*-pyrazolo-[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

25 ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-(3-methyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

30 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo<3,4-*b*>pyridine-5-N-(2-propenyl)carboxamide,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

35 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-ynyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

40 ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-enyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

45 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,

ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-(3-methyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

5 ester isobutylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,

10 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-(3-methyl-but-2-enyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

15 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylamide,

ethyl 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-hydroxamate,

20 15 ester prop-2-ynylque de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

25 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-propylamide,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,

30 30 ester 2-méthyl-allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-Amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamine (ICI 190,622),

35 4-amino-1-pent-4-ynyl-N-2-propenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-but-2-ynylamide,

40 40 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-(2-cyclopropyl-ethyl)-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

45 45 ester allylique de l'acide 4-amino-1-hex-5-ynyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,  
ester but-3-ényle de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
5 ester cyclopropylmethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
4-butylamino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,  
10 ester 2-cyclopropyl-ethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
15 ester cyclopropylmethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
ester cyclopropylmethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
20 ester éthylique de l'acide 4-amino-1-benzyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-benzylamide,  
25 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-phenylamide,  
ester benzylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
30 4-Azido-1-β-D-ribofuranosylpyrazolo[3,4-*b*]pyridine,  
1-pent-3-ynyl-N-2-propenyl-4-propionamido-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,  
35 2-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3,4-diol,  
2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-ethanol,  
40 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propan-1-ol,  
ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-acétique,  
45 ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propionique,

ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,

5 ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-benzoïque,

ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,

10 *N*-benzylidene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,  
*N*-furan-2-ylmethylen-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

15 *N*-(4-fluoro-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,  
*N*-(3-furan-2-yl-allylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

20 25 *N*-(4-methoxy-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,  
4-[(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazonomethyl]-benzonitrile,

30 *N*-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylen-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

35 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-nitro-benzylidene)-hydrazine,  
*N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,

40 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(5-nitro-furan-2-ylmethylen)-hydrazine,  
*N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,

45 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(6-nitro-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylen)-hydrazine,

Acide 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

5 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(pyridin-4-ylmethyl)-amide,

10 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-amide,

15 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(5-hydroxy-pentyl)-amide,

20 ester éthylique de l'acide 4-*tert*-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

25 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-cyclopropylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

30 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

35 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

40 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-(2-ethoxy-ethylamino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

45 ester éthylique de l'acide 4-benzylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

Parmi les dérivés de xanthine, on utilise en particulier (i) les ( $\omega$ -1)-hydroxyalkyl-dialkylxanthine où le groupe ( $\omega$ -1)-hydroxyalkyle contient 5 ou 6 atomes de carbone et est en position 1 ou 7, le groupe alkyle sur l'autre position 7 ou 1 contient de 1 à 12 atomes de carbone et le groupe alkyle en position 3 contient de 1 à 4 atomes de carbone, (ii) les ( $\omega$ -1)-oxoalkyl-diméthylxanthine où le groupe ( $\omega$ -1)-oxoalkyle contient 5 ou 6 atomes de carbone et est en position 1

ou 7, ou (iii) les dérivés de diméthylxanthine ayant un groupe alkyle contenant de 4 à 12 atomes de carbone ou un groupe benzyle en position 1 ou 7.

Typiquement, les oxoalkyl-dialkylxanthines incluent par exemple les 1-(5-

oxohexyl)-3,7- and 7-(5-oxohexyl)-1,3-dimethylxanthines. D'autres xanthines

5 peuvent également être utilisées telles que notamment les 3,7-diméthylxanthines et 1,3-diméthylxanthines substituées par un groupe butyle,

isoamyle, hexyle, lauryle ou benzyle en position 1 ou 7, ainsi que les

homologues de ces composés avec un groupe hydroxy ou oxo en position ( $\omega$ -

1)-position, ex. les 1-(4-hydroxypentyl)- et 1-(5-hydroxyhexyl)-3,7-

10 diméthylxanthines, 7-(4-hydroxypentyl)- et 7-(5-hydroxyhexyl)-1,3-

diméthylxanthines, 1-(4-oxopentyl)-, 1-(5-oxohexyl)-, 1-(2-methyl-3-oxobutyl)- et

1-(2-ethyl-3-oxobutyl)-3,7-diméthylxanthines et les composés 1,3-dimethyl

correspondant présentant le groupe ( $\omega$ -1)-hydroxyalkyl ou ( $\omega$ -1)-oxoalkyl en

position 7. Des homologues des hydroxyalkyl-diméthylxanthines mentionnés ci-

15 dessus, sont ceux présentant en position 1 ou 7 qui n'est pas occupée par un

groupe hydroxyalkyle, au lieu d'un groupe méthyle, un groupe alkyle ayant de 2

à 12 atomes de carbone, tel que 1-éthyl-, 1-propyl-, 1-butyl- et 1-isobutyl-3-

méthyl-7-(5-hydroxyhexyl)-xanthines et 7-éthyl-, 7-propyl-, 7-butyl- et 7-isobutyl-

1-(5-hydroxyhexyl)-3-méthylxanthines, et les composés correspondants

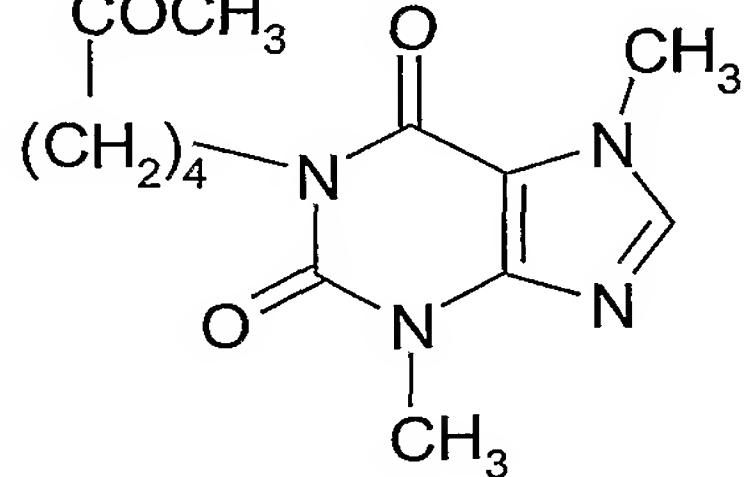
20 présentant à la place du radical méthyl en position un groupe alkyle de 2 à 4

atomes de carbone, tel que notamment un radical éthyl, n-propyle, isopropyle,

isobutyle ou n-butyle.

Parmi ces dérivés de xanthine, on utilise en particulier la pentoxifylline de

25 formule suivante :



La présente invention propose donc, pour la première fois, la PDE4B comme cible thérapeutique pour le traitement des événements moléculaires associés à l'excitotoxicité. Selon des modes de mise en œuvre particuliers, l'invention peut être utilisée pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce 5 des maladies neurodégénératives. Elle est applicable notamment au traitement de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, de l'ALS, de la chorée de Huntington ou de l'ischémie cérébrale.

D'autres objets de l'invention résident dans :

- 10 . l'utilisation des composés indiqués ci-dessus, en particulier de l'étazolate ou de la pentoxifylline, pour le traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce de l'ALS, ou
- 15 . l'utilisation des composés indiqués ci-dessus, en particulier de la pentoxifylline ou de l'étazolate, pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la PDE4B chez les patients atteints d'ALS.

L'invention concerne également des méthodes de traitement de l'ALS comprenant l'administration d'un composé inhibant sélectivement l'expression ou l'activité de la PDE4B de séquence SEQ ID n° 2 ou 4. De préférence, les 20 méthodes de l'invention sont utilisées pour le traitement en phase précoce des maladies neurodégénératives.

L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, de préférence par voie orale ou par injection, typiquement par voie intraperitoneale, intra-cérébrale, intra-veineuse, intra-artérielle ou intra-musculaire. 25 L'administration par voie orale est préférée. Les doses administrées peuvent être adaptées par l'homme de l'art. Typiquement, de 0,01 mg à 100 mg / kg environ sont injectés, pour des composés inhibiteurs de nature chimique. Pour des composés nucléiques, les doses peuvent varier par exemple entre 0,01 mg 30 et 100 mg par dose. Il est entendu que des injections répétées peuvent être réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres agents actifs ou tout

véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique (ex., tampons, solutions saline, isotonique, en présence d'agents stabilisants, etc.).

L'invention est utilisable chez les mammifères, notamment chez l'être humain.  
5 Les résultats présentés dans les exemples illustrent l'efficacité d'inhibiteurs de PDE4B pour améliorer la viabilité de neurones placés en conditions d'excitotoxicité.

10 Méthodes de sélection et outils

D'autres objets de l'invention concernent des méthodes de sélection, identification ou caractérisation de composés actifs sur les pathologies associées à l'excitotoxicité, ou au stress neuronal, comprenant la mise en 15 contact de composés tests avec une cellule exprimant la PDE4B (notamment un variant dépourvu de domaine 3' non-codant), et la mise en évidence des composés inhibant l'expression ou l'activité de cette protéine.

Les méthodes peuvent être mises en œuvre avec différentes populations 20 cellulaires, telles que des cellules primaires ou des lignées de cellules d'origine mammifère (humaine, murine, etc.). On utilise avantageusement des cellules qui n'expriment pas naturellement la PDE4B, transfectées avec un acide nucléique codant le variant souhaité. De cette manière, la sélectivité de la méthode est augmentée. On peut également utiliser des cellules eucaryotes inférieures 25 (levure, etc.) ou des cellules procaryotes.

Les méthodes de screening peuvent également être réalisées en système acellulaire, par mesure de la capacité de composés tests à lier la PDE4B ou un variant ou fragment de celle-ci.

30 Un autre objet de l'invention concerne tout acide nucléique codant un polypeptide tel que défini ci-dessus, les vecteurs le contenant, cellules

recombinantes, et utilisations. Les vecteurs peuvent être des plasmides, phages, cosmides, virus, chromosomes artificiels, etc. Des vecteurs préférés sont par exemple des vecteurs plasmidiques, comme ceux dérivés de plasmides commerciaux (pUC, pcDNA, pBR, etc.). De tels vecteurs comportent 5 avantageusement un gène de sélection et/ou une origine de réplication et/ou un promoteur transcriptionnel. D'autres vecteurs particuliers sont par exemple des virus ou des phages, notamment des virus recombinants défectifs pour la réplication, tels que des virus dérivés de rétrovirus, adénovirus, AAV, herpès-virus, baculovirus, etc. Les vecteurs peuvent être utilisés dans tout hôte 10 compétent, comme par exemple des cellules prokaryotes ou eukaryotes. Il peut s'agir de bactéries (par exemple *E. coli*), levures (par exemple *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*), cellules végétales, cellules d'insectes, cellules de mammifères, notamment humaines, etc. Il peut s'agir de lignées, cellules primaires, cultures mixtes, etc.

15

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

20

## **LEGENDE DES FIGURES**

Figure 1: PCR semi-quantitative de PDE4B à partir d'échantillons de cerveau (1A) et de muscle (1B).

Figure 2: La pentoxifylline protège les neurones primaires de granules cérébelleux de l'excitotoxicité induite par le kainate.

Figure 3: La pentoxifylline protège les neurones primaires de granules cérébelleux de l'excitotoxicité induite par NMDA/serine.

Figure 4: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les cellules granulaires du cervelet.

30 Figure 5: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le kainate sur les cellules granulaires du cervelet.

Figure 6: Effet neuroprotecteur de la pentoxyfylline sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les neurones corticaux.

Figure 7: Effet neuroprotecteur de la pentoxyfylline sur la toxicité induite par le kainate sur les neurones corticaux.

5 Figure 8: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les neurones corticaux.

Figure 9: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le kainate sur les neurones corticaux.

10 Figure 10: Effet neuroprotecteur du 8-bromo-cAMP sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les cellules granulaires du cervelet.

Figure 11: Effet neuroprotecteur du 8-bromo-cAMP sur la toxicité induite par le kainate sur les cellules granulaires du cervelet.

## **EXEMPLES**

15

### **Exemple 1 : Identification de la PDE4 comme cible moléculaire de l'excitotoxicité**

L'analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN poly adénylés (poly A+) extraits d'échantillons de cerveaux d'animaux correspondant aux différents stades, sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum d'évènements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie.

20 Les ARN poly A+ sont préparés selon des techniques connues de l'homme de métier. Il peut s'agir en particulier d'un traitement au moyen d'agents chaotropiques tels que le thiocyanate de guanidium suivi d'une extraction des ARN totaux au moyen de solvants (phénol, chloroforme par exemple). De telles méthodes sont bien connues de l'homme du métier (voir Maniatis et al., Chomczynsli et al., Anal. Biochem. 162 (1987) 156), et peuvent être aisément pratiquées en utilisant des kits disponibles dans le commerce. A partir de ces ARN totaux, les ARN poly A+ sont préparés selon des méthodes classiques connues de l'homme de métier et proposées par des kits commerciaux.

Ces ARN poly A+ servent de matrice à des réactions de transcription inverse à l'aide de reverse transcriptase. Avantageusement sont utilisées des reverse transcriptases dépourvues d'activité RNase H qui permettent d'obtenir des premiers brins d'ADN complémentaire de tailles supérieures à ceux obtenus 5 avec des reverse transcriptases classiques. De telles préparations de reverse transcriptases sans activité RNase H sont disponibles commercialement.

Pour chaque point de la cinétique de développement de la pathologie (30 jours, 60 jours et 90 jours) les ARN poly A+ ainsi que les ADNc simple brins sont préparés à partir des animaux transgéniques (T) et des animaux contrôles 10 syngéniques (C).

Conformément à la technique DATAS, pour chaque point de la cinétique sont réalisées des hybridations d'ARNm (C) avec des ADNc (T) et des hybridations réciproques d'ARNm (T) avec des ADNc (C).

Ces hétéroduplex ARNm/ADNc sont ensuite purifiés selon les protocoles de la 15 technique DATAS.

Les séquences d'ARN non appariées avec un ADN complémentaire sont libérées de ces hétéroduplex sous l'action de la RNase H, cette enzyme dégradant les séquences d'ARN appariées. Ces séquences non appariées représentent les différences qualitatives qui existent entre des ARN par ailleurs 20 homologues entre eux. Ces différences qualitatives peuvent être localisées n'importe où sur la séquence des ARN, aussi bien en 5', 3' ou à l'intérieur de la séquence et notamment dans la séquence codante. Selon leur localisation, ces séquences peuvent être non seulement des modifications d'épissage mais également des conséquences de translocations ou de délétions.

25 Les séquences d'ARN représentant les différences qualitatives sont ensuite clonées selon les techniques connues de l'homme de métier et notamment celles décrites dans le brevet de la technique DATAS.

Ces séquences sont regroupées au sein de banques de cDNA qui constituent 30 des banques qualitatives différentes. Une de ces banques contient les exons et les introns spécifiques de la situation saine ; les autres banques contiennent les événements d'épissage caractéristiques des conditions pathologiques.

L'expression différentielle des clones a été vérifiée par hybridation avec des sondes obtenues par reverse-transcription à partir d'ARN messagers extraits des différentes situations étudiées. Les clones hybridant de façon différentielle ont été retenus pour analyse ultérieure. Les séquences identifiées par DATAS 5 correspondent à des introns et/ou à des exons exprimées de façon différentielle par épissage entre les situations pathologiques et la situation saine. Ces évènements d'épissage peuvent être spécifiques d'une étape donnée du développement de la pathologie ou caractéristiques de l'état sain.

10 La comparaison de ces séquences avec les banques de données permet de classifier les informations obtenues et de proposer une sélection raisonnée des séquences selon leur intérêt diagnostique ou thérapeutique.

15 La réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques 20 âgés de 60 jours a permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de la phosphodiesterase 4B. Ce fragment correspond à un fragment d'exon spécifiquement présent dans les animaux contrôles et donc spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce fragment recouvre les nucléotides 377 à 486 référencés à partir du codon stop de la PDE4B de souris (SEQ ID NO :1). Cette séquence comprend 2912 bases, le fragment délété correspondant aux bases 2760 à 2869. Cette région est non codante et est exprimée différemment entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques, du fait de l'utilisation alternative d'un exon 3' non codant ou du fait de l'utilisation de deux sites de polyadénylation alternatifs.

25

**Exemple 2 : Expériences de RT-PCR : Confirmation de l'expression différentielle :**

30 L'expression différentielle de la PDE4B dans une situation de stress neuronal, par rapport à une situation de référence, a été vérifiée par des expériences de RT PCR présentées sur la figure 1.

Ces expériences ont été réalisées selon des techniques bien connues de l'homme de métier et ont permis de suivre les expressions de deux régions distinctes de l'ARNm de la PDE4B. Une de ces régions recouvre le codon d'initiation de cet ARNm (PDE4B 5'), l'autre recouvre en partie le fragment 5 identifié selon la technique DATAS (PDE4B DATAS). Les localisations des amorces de PCR utilisées sont indiquées sur la figure 1.

L'ARN PO correspond à un ARN ribosomal utilisé comme contrôle interne destiné à vérifier que la même quantité d'ARN est utilisée pour chaque point expérimental. Les analyses ont été réalisées à partir d'ARN extraits d'animaux 10 contrôles (C) et transgéniques (T) âgés de 30, 60 et 90 jours, c'est à dire avant l'apparition des symptômes pathologiques.

Les ARN totaux du cerveau des souris contrôle ou SOD1 G93A âgées 30, 60 et 90 jours sont transcrits en ADNc utilisant le protocole standard de Superscript<sup>TM</sup> (Invitrogen). Pour les PCR semi-quantitatives les produits de la réaction de 15 reverse transcription sont dilués 10 fois. Les amorces spécifiques du fragment DATAS correspondent pour le sens aux nucléotides 2526-2545 (5' GCC AGG CCG TGA AGC AAA TA 3' ; SEQ ID NO : 5), et pour l'anti-sens aux 2790-2807 (5' TCA AAG ACG CGA AAA CAT 3'; SEQ ID NO : 6) et pour le fragment plus en 3 prime les amorces correspondent pour le sens aux nucléotides 145-165 (5' CCG CGT CAG TGC CTT TGC TAT 3'; SEQ ID NO : 7), et pour l'anti-sens aux 20 426-404 (5' CGC TGT CGG ATG CTT TTA TTC AC 3'; SEQ ID NO : 8). Comme gène de référence le gène P0 est utilisé et amplifié par les amorces, sens : 5' TCG CTT TCT GGA GGG TGT C 3' (SEQ ID NO : 9) et anti-sens : CCG CAG GGG CAG CAG TGG 3' (SEQ ID NO :10).

25 L'amplification est effectuée par 30 cycles de PCR suivants :

- 30 secondes à 94°C
- une minute à 57°C
- 30 secondes à 72°C, suivi par un cycle de 2 minutes à 72°C

Les différents produits de PCR sont mis sur un gel d'agarose de 1.5 %. 30 L'expérience est répétée trois fois avec deux réactions de reverse transcription différentes.

La figure 1 présente les résultats obtenus à partir d'ARN extraits des cerveaux ou des muscles des animaux.

Alors que la même quantité d'ADNc est amplifiée à partir de l'ARN de PO dans tous les échantillons, de variations sont observées pour l'ARNm de la PDE4B :

5 les variations les plus significatives sont détectées chez les animaux âgés de 90 jours : alors qu'une augmentation du niveau d'expression du fragment PDE4 5' est observée dans le cerveau des animaux transgéniques, une très forte diminution de l'expression de PDE4B (DATAS) est observée dans le cerveau des animaux transgéniques.

10 Ce résultat établit une corrélation entre la diminution de l'expression d'un fragment 3' non codant de l'ARNm de la PDE4B et l'augmentation de l'expression de la partie 5' codante de ce même messager. Ce résultat est tout à fait compatible avec la présence de séquences de déstabilisation des ARNm dans la séquence identifiée par DATAS et démontre la corrélation entre 15 l'expression de PDE4B et le phénomène d'excitotoxicité.

### **Exemple 3 : Inhibition de l'excitotoxicité par des inhibiteurs de PDE4**

Pour cet exemple, des neurones granulaires du cervelet de rat ainsi que des 20 neurones corticaux ont été mis en culture selon les techniques connues de l'homme de métier.

#### Culture primaire des cellules granulaires de cervelet :

Les rats Wistar âgés de sept jours sont décapités et leurs cervelets sont 25 disséqués. Après avoir enlevé les méninges, le tissu est coupé en petits morceaux et trypsinisé pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont dissociées par trituration et mises en cultures à une densité 300.000 cellules par cm<sup>2</sup> dans du milieu basal Eagle supplémenté avec 10% du sérum de veau fœtal et 2 mM glutamine. Le lendemain 10 µM ARA-C, un anti-mitotique, est ajouté pour 30 empêcher la prolifération des cellules gliales. Les cellules sont traitées le jour 9 de cultures avec les phosphodiesterase inhibiteurs, pentoxifylline et étazolate, trois heures avant l'addition des toxiques, 50 µM kainate ou 100 µM N-methyl-D-

aspartate en présence de 10  $\mu$ M D-sérine. Le 8-bromo-cAMP est ajouté juste avant les toxiques. Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. Après une incubation de six heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du 5 non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est déterminée à  $p$  inférieur ou égal à 0.05.

Cultures primaires des cellules corticales :

Des embryons de rat Wistar, âgés de 16 jours, sont prélevés et les cortex sont 10 disséqués. Après la trypsination à 37°C pendant 25 minutes, les cellules sont dissociées par trituration. Les cellules sont ensemencées dans du milieu essentiel minimum, supplémenté avec 10% de sérum de cheval et 10% de sérum de veau fœtal et 2 mM glutamine, à une densité de 300.000 cellules par 15  $\text{cm}^2$ . Après 4 jours en culture la moitié du milieu est changée avec du milieu essentiel minimum supplémenté avec 5% de sérum de cheval et 2 mM glutamine. Le même jour, 10  $\mu$ M de 5-fluoro-2-deoxyuridine, un anti-mitotique, est ajouté. Après sept et onze jours de culture, la moitié du milieu est changée 20 par du milieu conditionné. Le milieu conditionné est composé de MEM contenant 5 % de sérum de cheval et 2 mM glutamine ; ce milieu est passé sur un tapis d'astrocytes corticales pendant une nuit avant son utilisation. A jour 14, les cellules sont traitées avec les phosphodiesterase inhibiteurs, pentoxifylline et étazolate, une heure avant l'addition des toxiques, 50  $\mu$ M kainate ou 20  $\mu$ M N-methyl-D-aspartate en présence de 10  $\mu$ M D-sérine. Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. 25 Après une incubation de six heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est déterminée à  $p$  inférieur ou égal à 0.05.

30 MTT:

La toxicité est mesurée en utilisant le test MTT. Après l'incubation avec les composés, du MTT est ajouté à une concentration finale de 0.5 mg/ml par puits.

Les plaques sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 37 °C dans le noir. Le milieu est aspiré et les cristaux sont resuspendus dans 500 µl de DMSO (dimethylsulfoxyde). L'absorbance à 550 nm est lue et le pourcentage de viabilité est calculé.

5

Résultats :

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 2-10. Ces résultats illustrent l'effet protecteur des composés de l'invention sur la survie neuronale. Lors du 10 co-traitement des neurones par un inhibiteur de PDE4, un effet protecteur dose-dépendant est observé dans les deux modes d'induction de l'excitotoxicité (NMDA/Serine et kainate). Un tel effet protecteur est observé à l'aide de la pentoxyfylline et de l'étazolate.

15 Les figures 2 et 3 présentent des résultats obtenus à l'aide de la pentoxyfylline sur les cellules granulaires du cervelet. Les résultats présentés montrent que la pentoxyfylline permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 43% dans le cas du traitement NMDA/serine, et de 33% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

20

Les figures 4 et 5 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les cellules granulaires du cervelet. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 60% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 57% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

25

Les figures 6 et 7 présentent des résultats obtenus à l'aide de la pentoxyfylline sur les neurones corticaux. Les résultats présentés montrent que la pentoxyfylline permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 50% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 66% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

Les figures 8 et 9 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les neurones corticaux. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 33% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 25% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

5

La pertinence de ces protections est attestée par les % de protection obtenus par des concentrations croissantes d'AMPc, substrat des PDE, donnés à titre d'exemple pour les cellules granulaires du cervelet sur les figures 10 et 11. Ces % sont de 40% pour le traitement NMDA/serine et de 40% pour le traitement 10 kainate.

La présente invention documente donc non seulement l'implication de la PDE4B dans les mécanismes d'excitotoxicité, notamment dans un modèle d'ALS, mais également la capacité d'inhibiteurs de PDE4 à préserver la viabilité neuronale 15 lors de stress liés à l'excitotoxicité.

#### **Exemple 4 : Utilisation clinique chez l'homme**

Cet exemple décrit les conditions d'une utilisation en clinique humaine d'un 20 inhibiteur de PDE4, dans le traitement de l'ALS. Cet exemple illustre le potentiel thérapeutique de l'invention et ses conditions d'application à l'être humain.

Dans cet essai clinique, le traitement est basé sur une combinaison de 25 pentoxifylline et de riluzole. La dose de pentoxifylline utilisée est de 400 mg par administration, sous forme de trois prises quotidiennes, soit une dose quotidienne totale de 1200 mg. La pentoxifylline est utilisée sous forme de comprimés. L'essai est multi-centrique et réalisé en double-aveugle contre 30 placebo sur 400 patients. Les patients inclus dans l'essai sont des hommes ou des femmes âgés de 18 à 80 ans, atteints d'ALS sporadique ou familiale, et sous traitement par le riluzole (50 mg b.i.d.) depuis 3 mois au moins. Le traitement à la pentoxifylline est prévu sur une durée de 18 mois.

L'efficacité est mesurée principalement par le taux de survie des patients, la qualité de vie, des tests musculaires.

D'autres aspects et applications de l'invention résident dans :

5

- l'utilisation de tout ou partie d'une séquence dérivée de l'ARN messager de la PDE4B à des fins de diagnostic ou de dépistage ou de caractérisation de pathologies neurodégénératives ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'excitotoxicité, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de 10 Parkinson, la sclérose en plaques, la chorée de Huntington, l'ALS ou l'ischémie cérébrale,

- l'utilisation de tout fragment d'acide nucléique y compris des ARN anti-sens dans le but d'inhiber l'expression de la PDE4B chez les patients atteints de telles pathologies,

15 - l'utilisation de tout composé chimique, notamment de la pentoxifylline, de l'étazolate, ou de toute composition pharmaceutique les contenant, dans le but d'inhiber l'activité de la PDE4B chez les patients atteints de telles pathologies,

- l'utilisation de tout ou partie d'une séquence dérivée de l'ARN messager de la PDE4B à des fins de caractérisation du tissu et de la situation ischémique.

20

REVENDICATIONS

1. Méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la mesure *in vitro* de l'expression de la phosphodiésterase 4, notamment de la phosphodiésterase 4B dans un échantillon provenant du sujet.  
5
2. Méthode selon la revendication 1, comprenant la détection de la présence d'une forme mutée de l'ARN de la phosphodiésterase 4, notamment de la phosphodiésterase 4B dans un échantillon provenant du sujet, en particulier 10 d'une forme délétée de tout ou partie de la région 3' non-codante.
3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, comprenant la mise en contact *in vitro* d'un échantillon biologique d'un sujet, contenant un acide nucléique, avec un 15 acide nucléique comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée du gène ou de l'ARN messager de la PDE4B, et la détection de la formation d'un hybride.
4. Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'échantillon comprend des cellules nerveuses ou musculaires.  
20
5. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour le diagnostic ou la détection de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, de la chorée de Huntington, de l'ALS ou de l'ischémie cérébrale.  
25
6. Utilisation d'au moins un composé inhibant ou réduisant l'expression ou l'activité de la PDE4, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies neurodégénératives.
- 30 7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le composé est un acide nucléique anti-sens capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou la traduction du messager correspondant.

8. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le composé est un composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique.
- 5 9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le composé est choisi parmi les composés de la famille des pyrazolopyridines, en particulier l'étazolate, et les composés de la famille des dérivés de xanthine, en particulier la pentoxifylline.
- 10 10. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 9, pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce des maladies neurodégénératives.
11. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 10, pour améliorer la survie neuronale chez les patients atteints d'ALS.
- 15 12. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 11, pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, de la chorée de Huntington ou de l'ischémie cérébrale.
- 20 13. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 11, pour le traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce de l'ALS.
14. Utilisation de la pentoxifylline pour la préparation d'une composition destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints d'ALS.
- 25 15. Utilisation de l'étazolate pour la préparation d'une composition destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints d'ALS.
16. Utilisation d'au moins un composé inhibiteur de PDE4 appartenant à la 30 famille des pyrazolopyridines, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints d'ALS.

17. Amorce nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle est composée d'un fragment de 8 à 20 résidus consécutifs de la séquence comprise entre les nucléotides 2384 et 2869 de la séquence SEQ ID NO :1 ou entre les nucléotides 5 2461 et 4068 de la séquence SEQ ID NO :3 ou d'une séquence complémentaire de celles-ci.

18. Kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, notamment de l'expression différentielle entre la région 3' non-codante et la région codante, le kit 10 comprenant une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de la région 3' non-codante et une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de la région codante.

19. Kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, notamment de l'expression 15 différentielle entre la région 3' non-codante et la région codante, le kit comprenant un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région 3' non-codante de la PDE4 et un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région codante de la PDE4.

**Analyse d'expression d'isoforme de PDE4B dans le cerveau par  
PCR semi-quantitative**

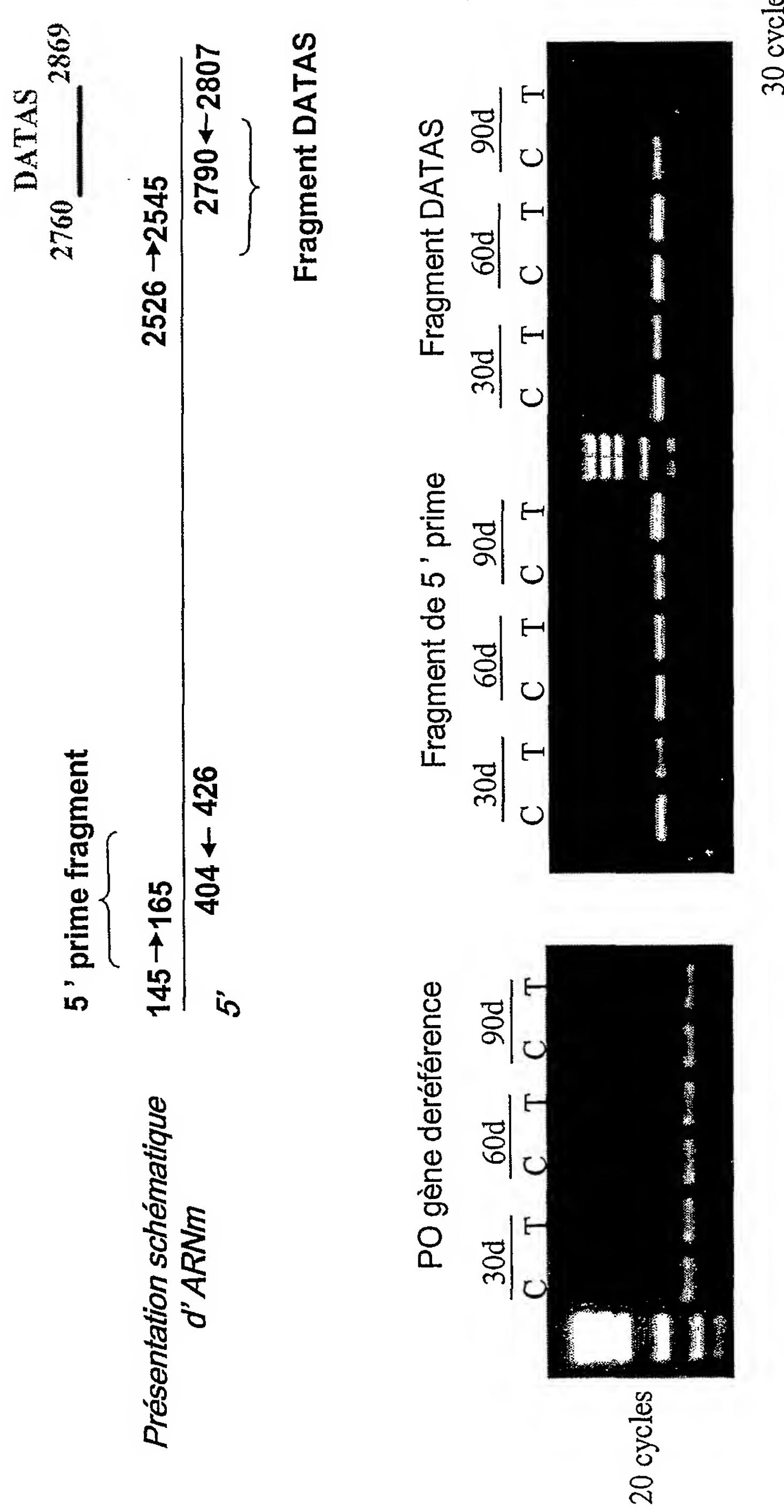


Figure 1A

**MUSCLE**

PDE4B (5')

145 $\blacktriangleright$ 165

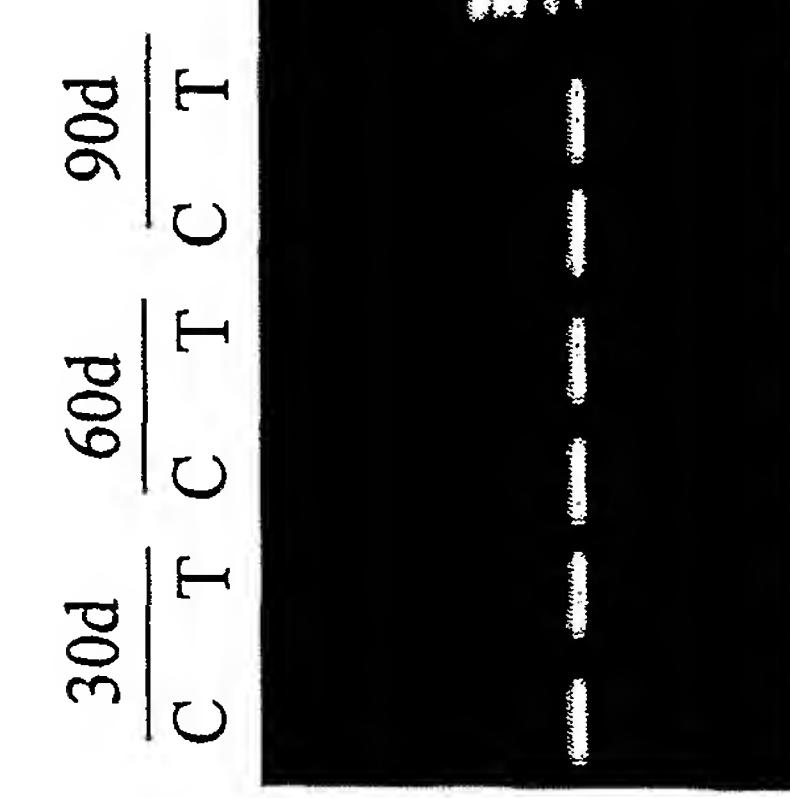
404 $\blacktriangleleft$  426

2526 $\blacktriangleright$ 2545

2790 $\blacktriangleleft$  2807

DATA5  
2760 \_\_\_\_\_ 2869

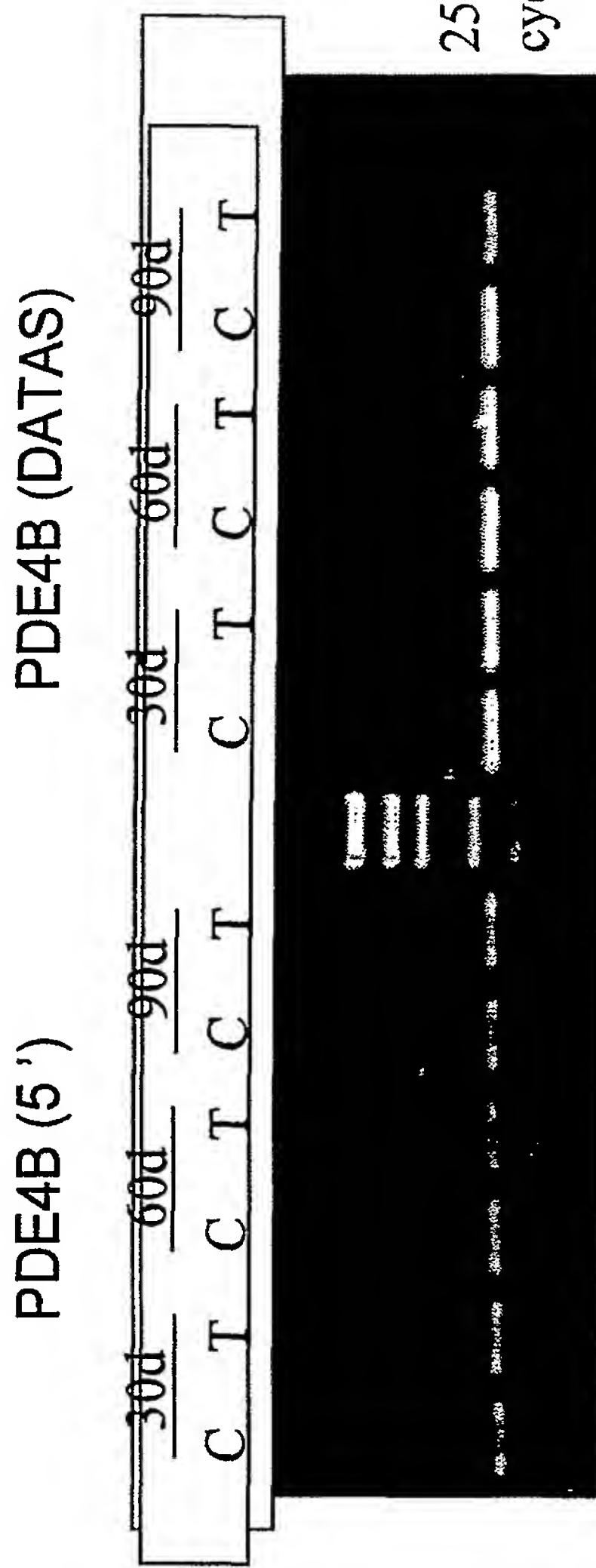
PO  
 $\frac{30d}{C\ T}$     $\frac{60d}{C\ T}$     $\frac{90d}{C\ T}$



20 cycles

PDE4B (DATA5)

PDE4B (5')

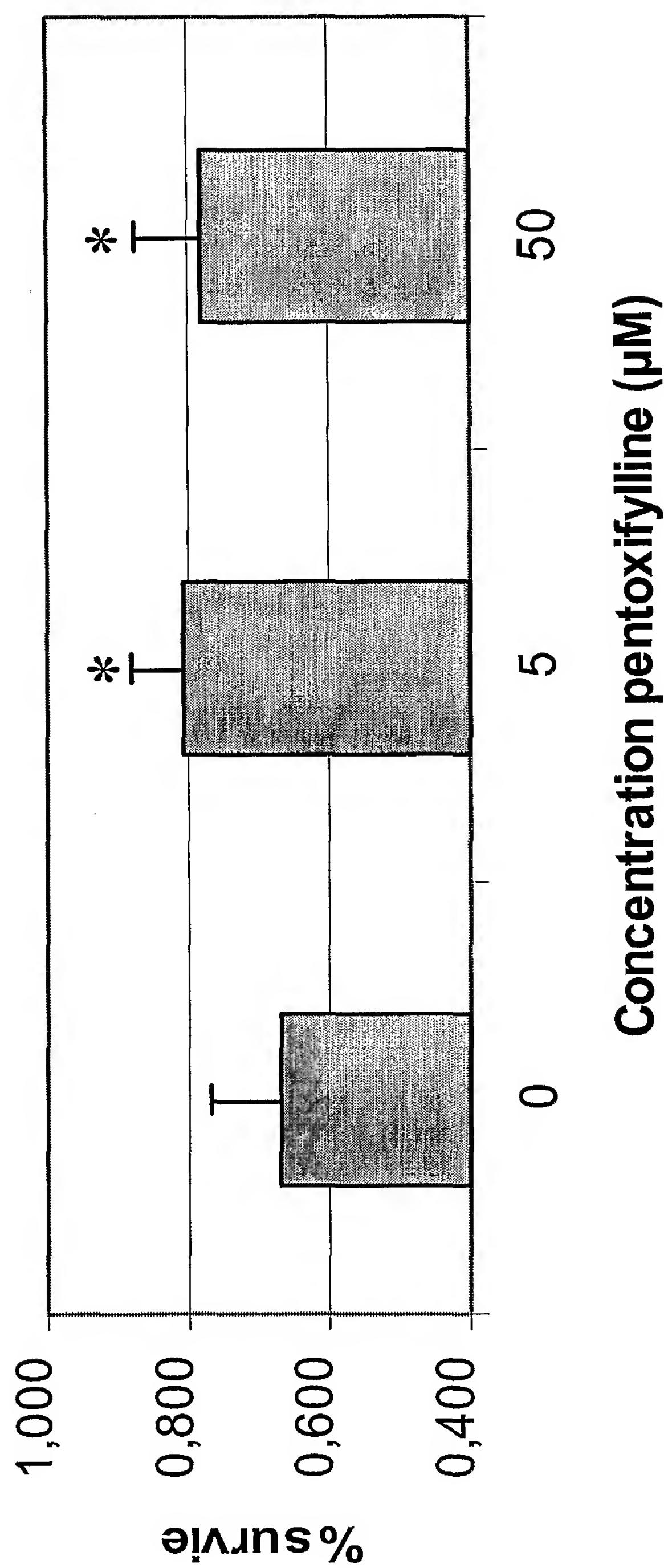


25  
cycles

2/12

PDE4B (DATA5)

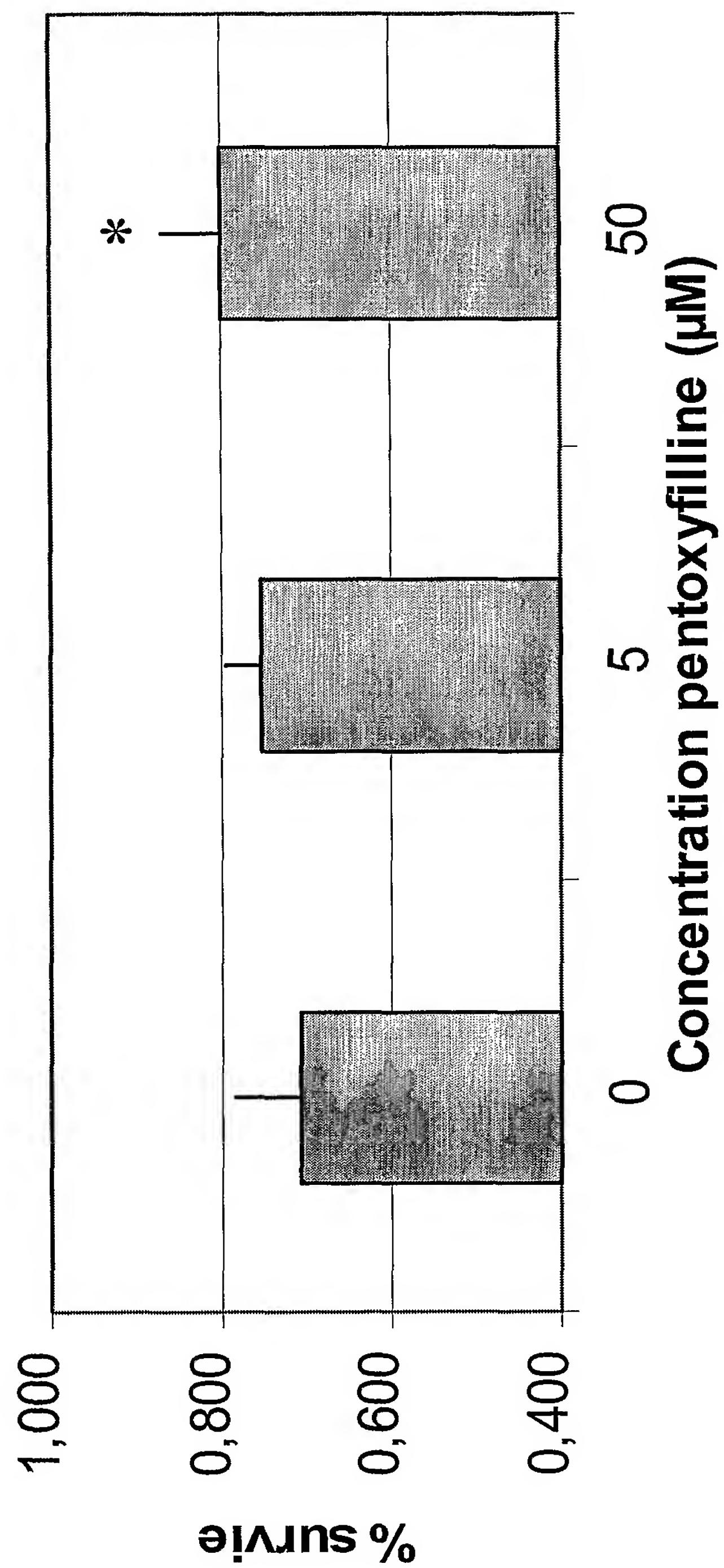
3/12



\*:  $p < 0.05$  Wilcoxon test

Figure 2

4/12



\* :  $p < 0.05$  Wilcoxon test

Figure 3

5/12

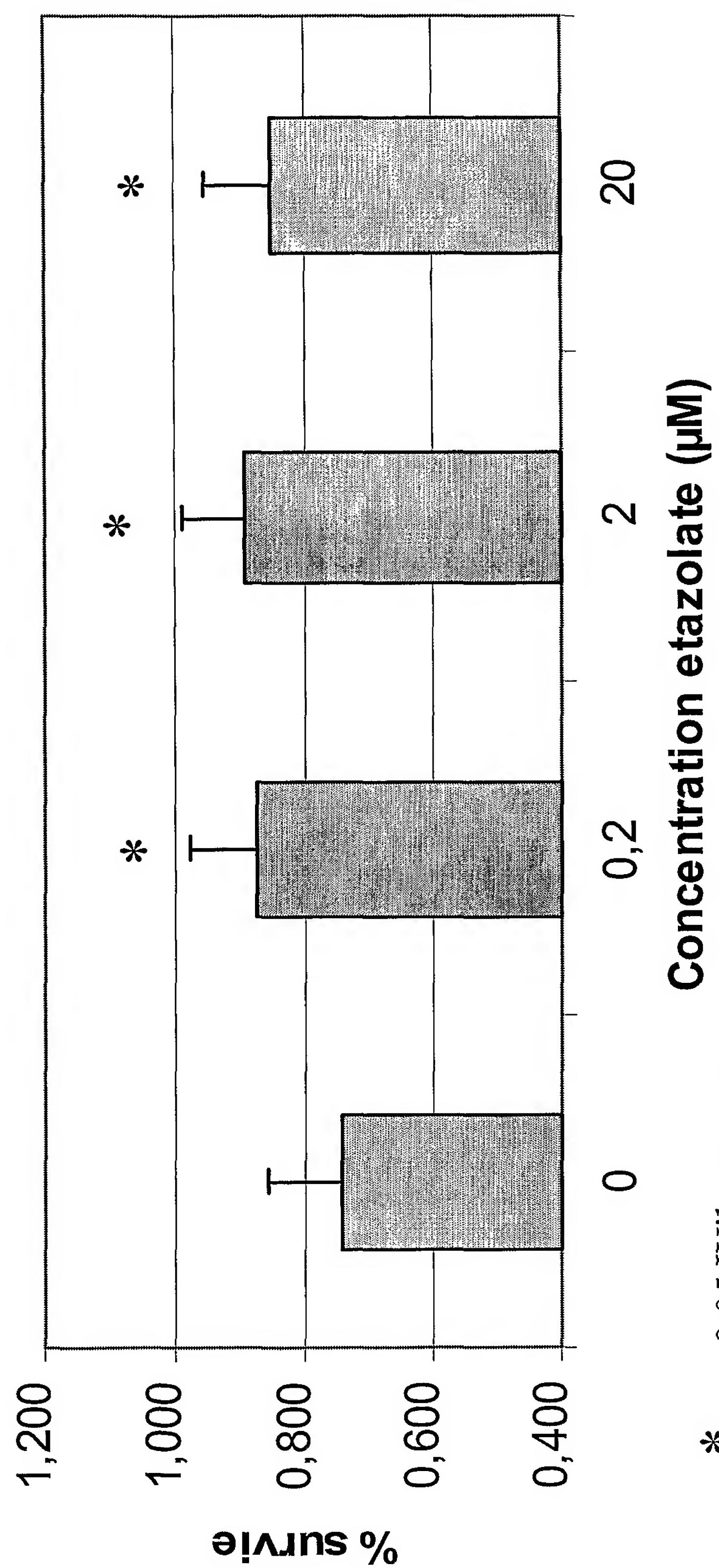


Figure 4

6/12

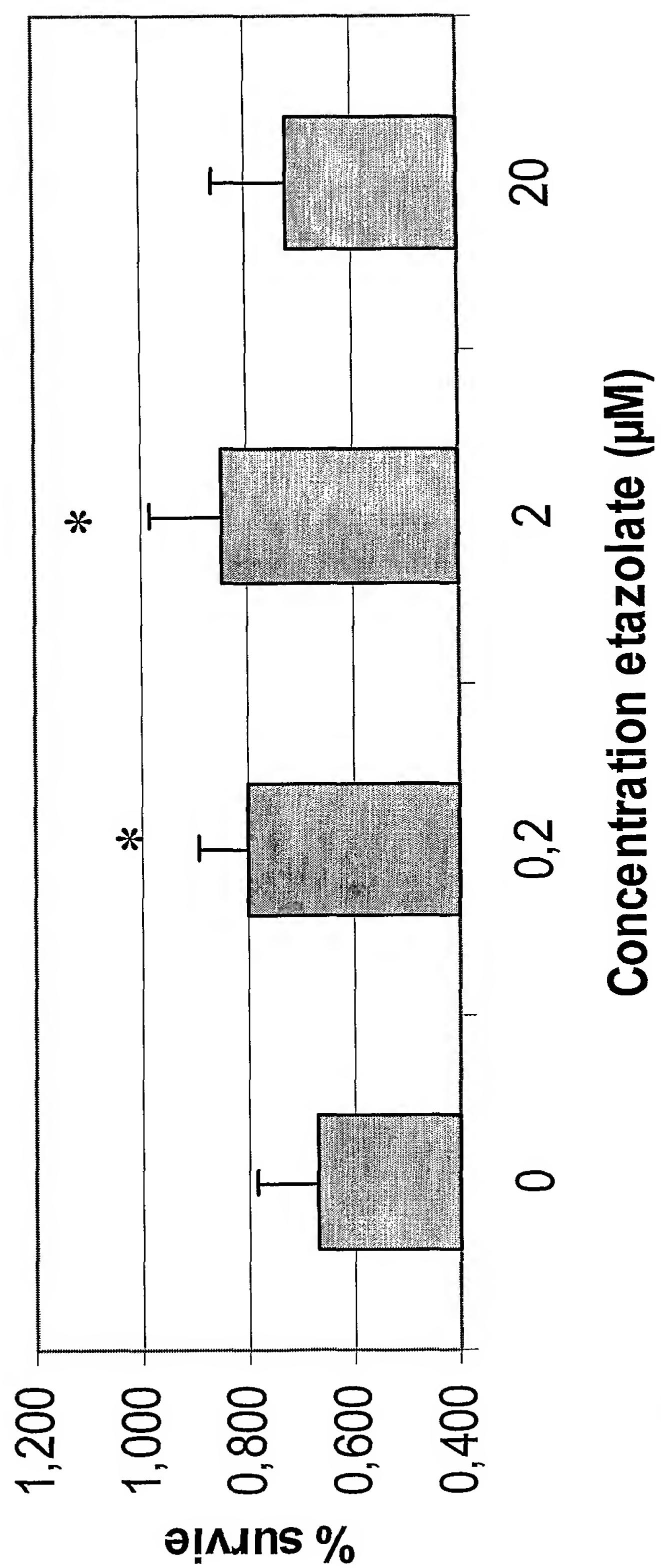
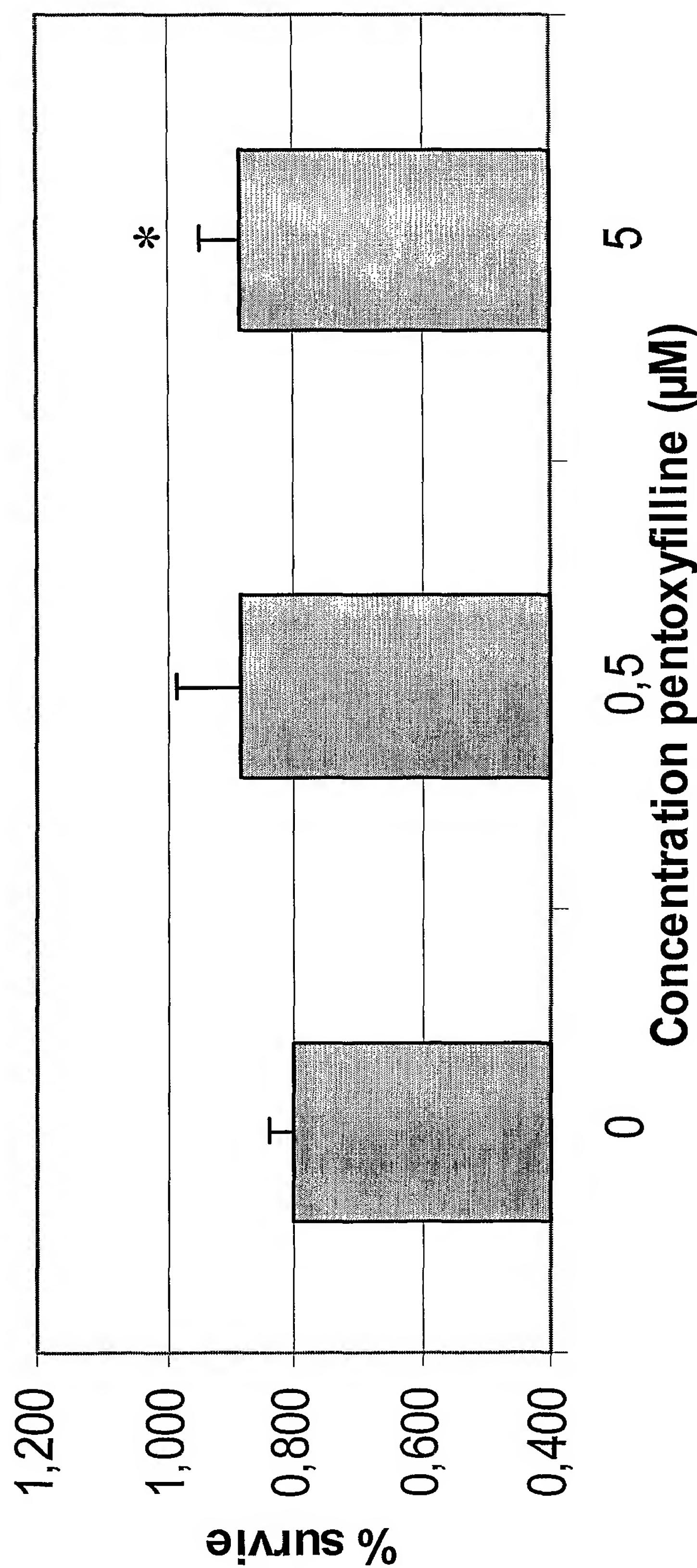


Figure 5

7/12



\* :  $p < 0.05$  Wilcoxon test

Figure 6

8/12

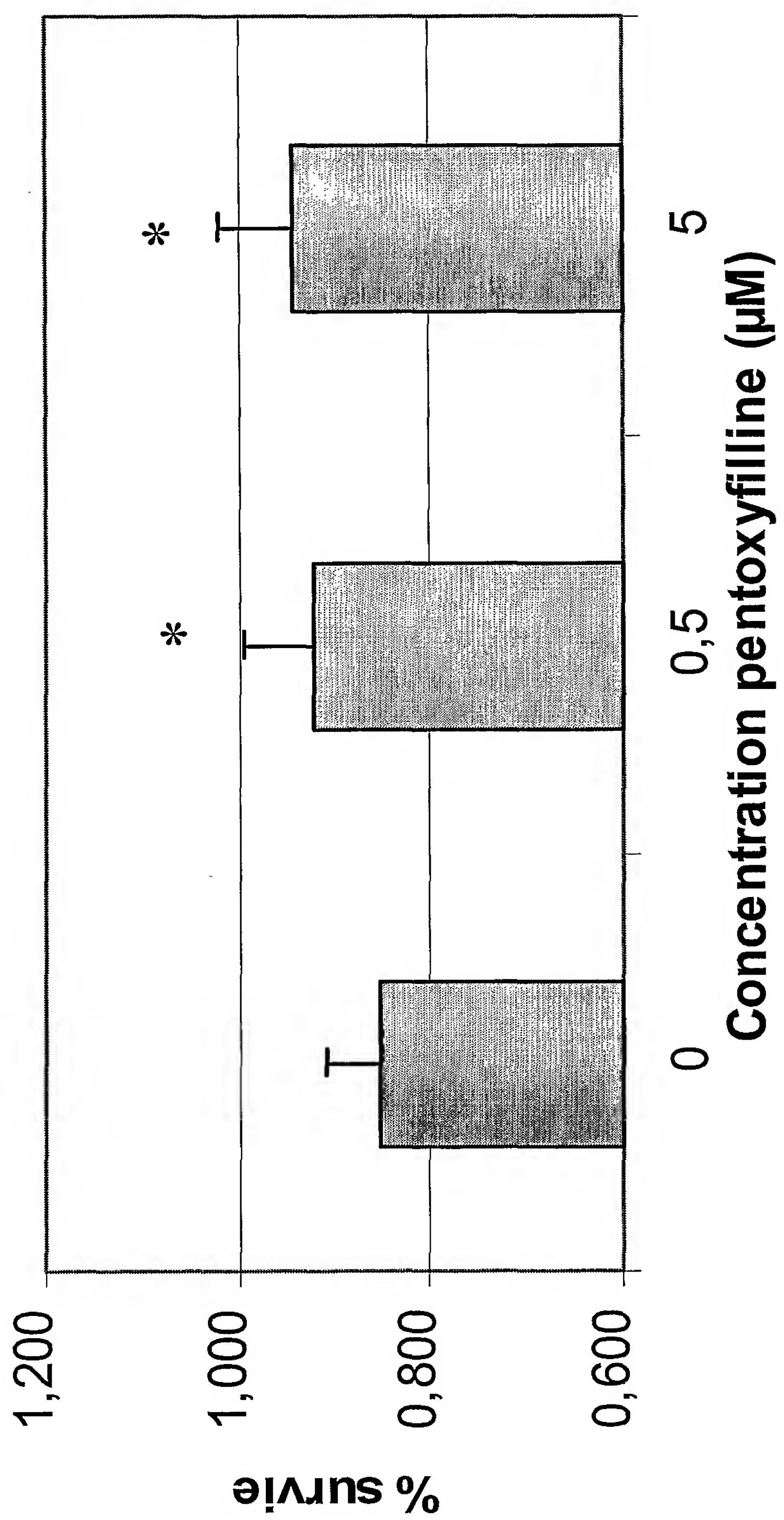
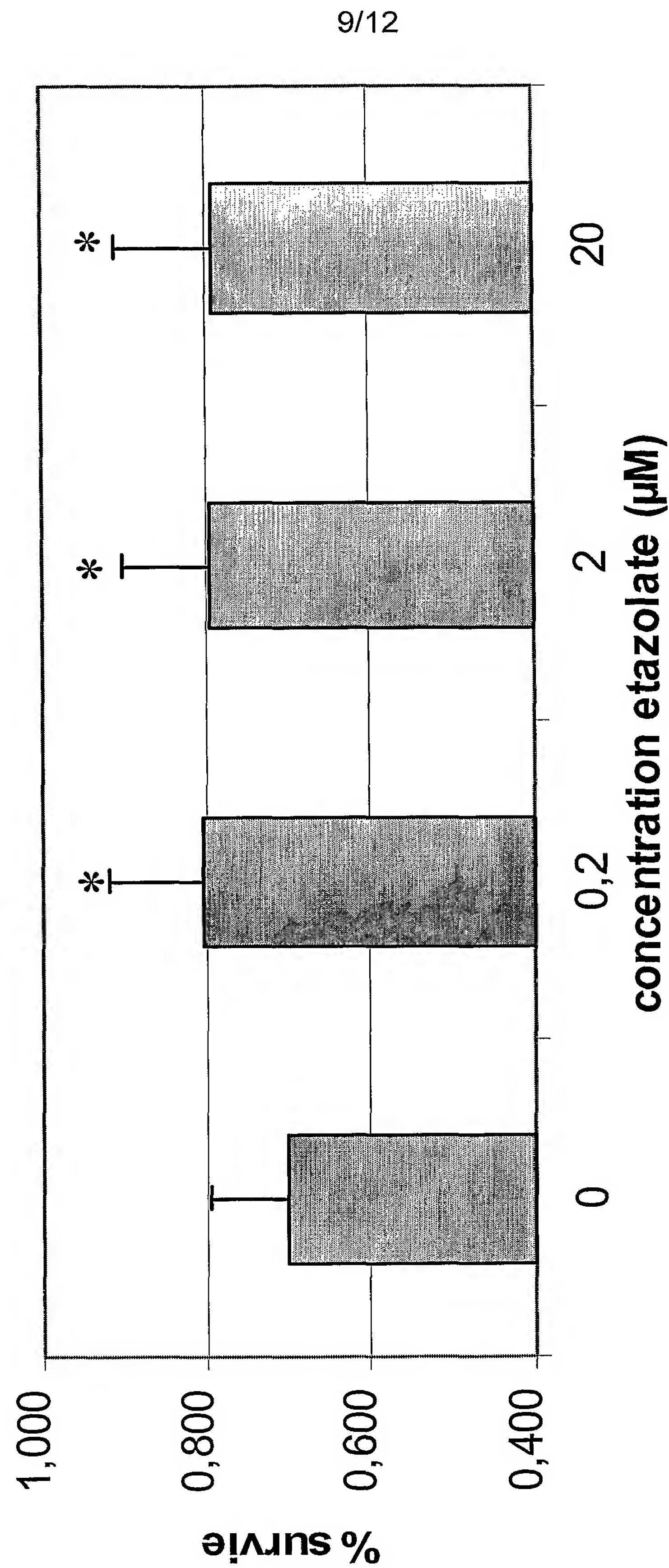


Figure 7



\*:  $p < 0.05$  Wilcoxon test

Figure 8

10/12

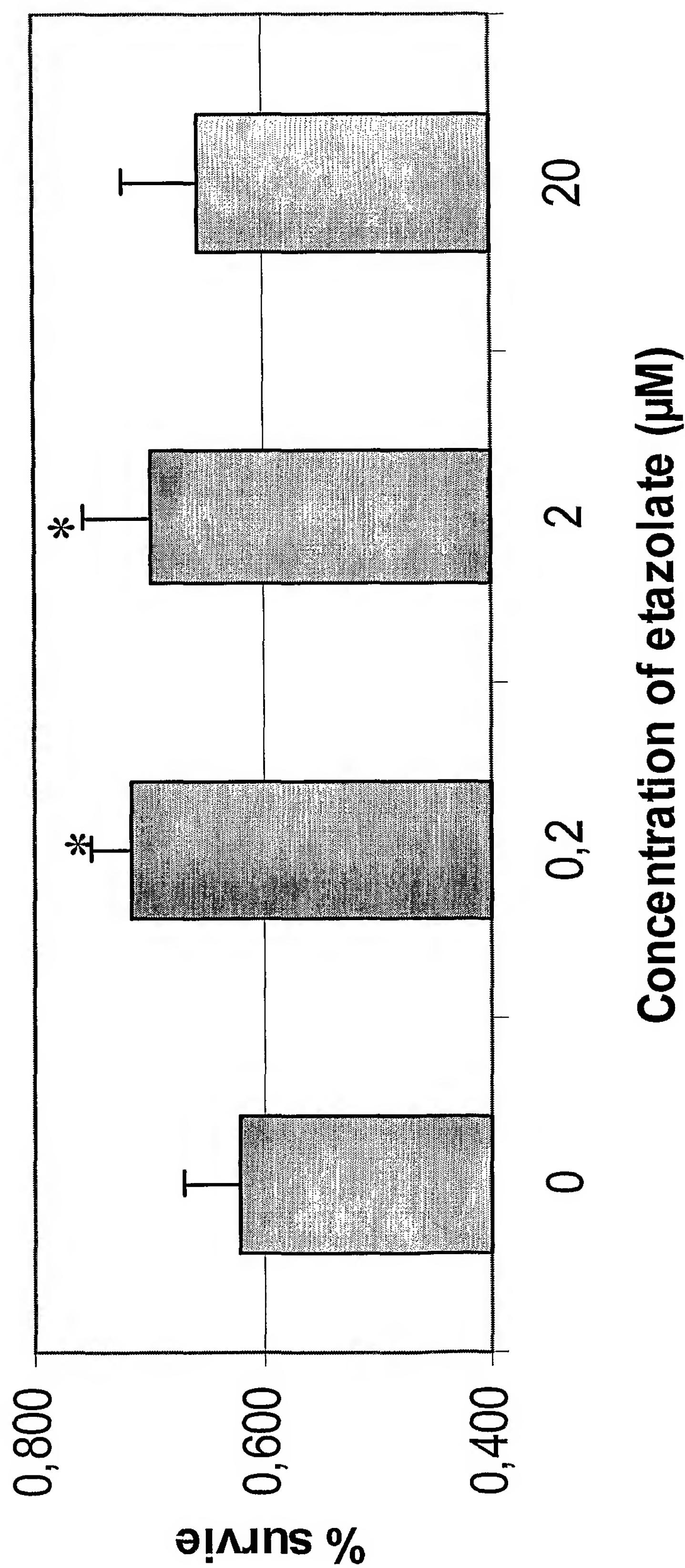


Figure 9

11/12

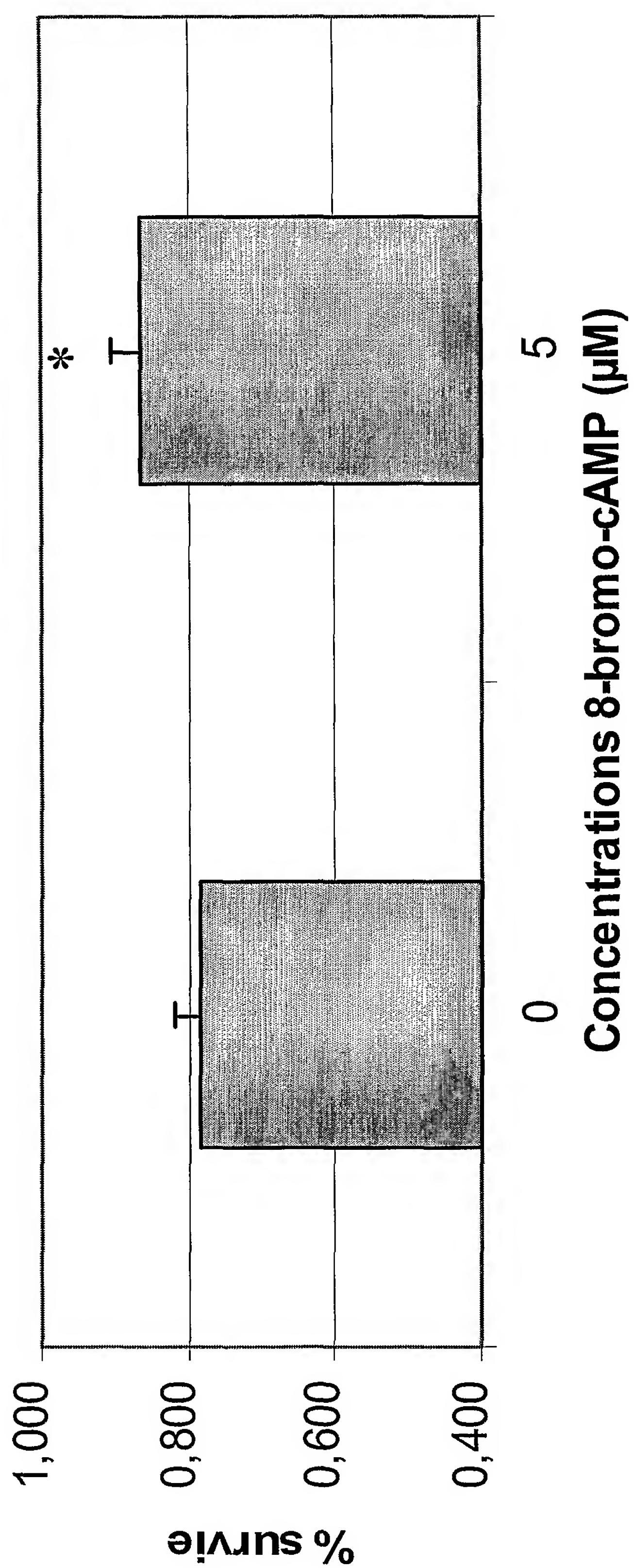
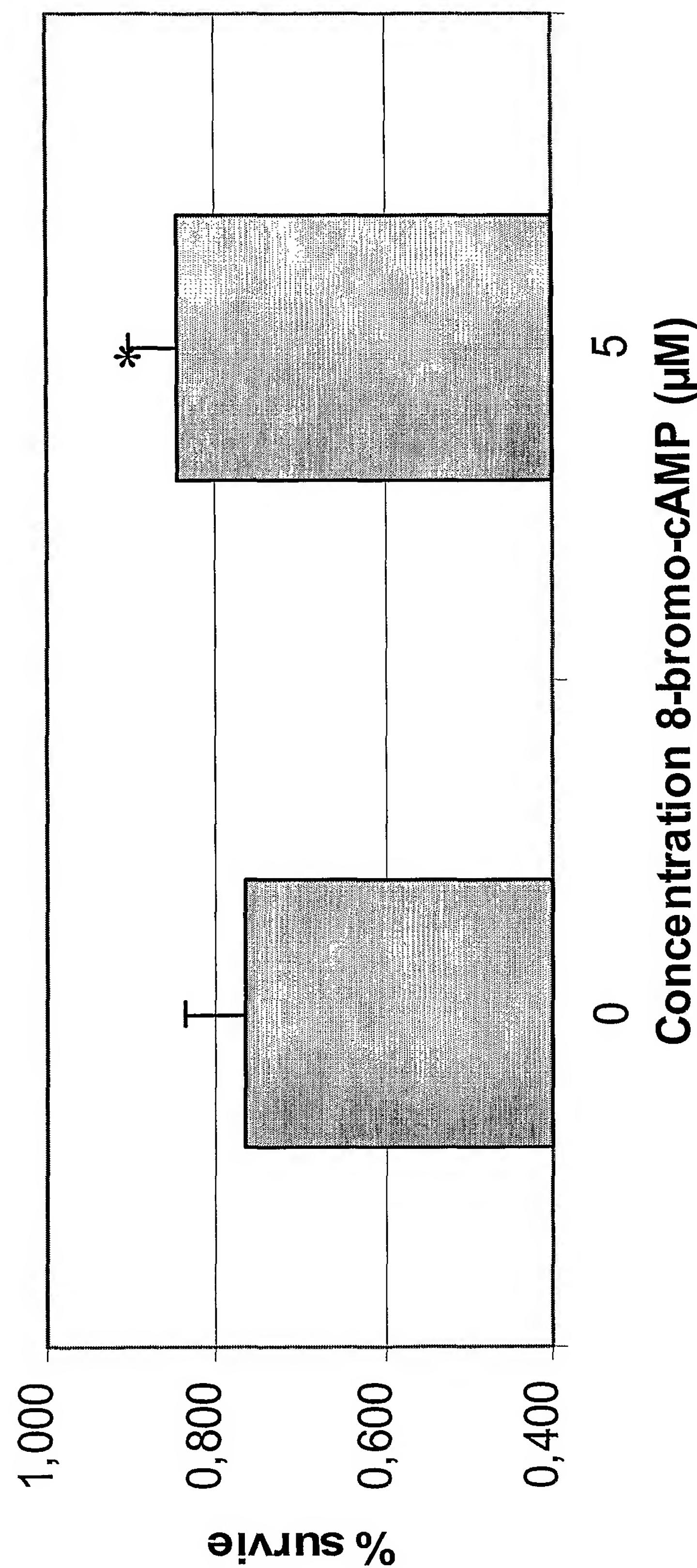


Figure 10

\*:  $p < 0.05$  Wilcoxon test

12/12



\*:  $p < 0.05$  Wilcoxon test

Figure 11

## LISTE DE SEQUENCES

<110> Exonhit Therapeutics

<120> Nouvelle cible moléculaire de la Neurotoxicité

<130> B0100WO

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2912

<212> ADN

<213> souris

<220>

<221> CDS

<222> (218)..(2383)

<400> 1

aaaggcagcc tgataaaagct ccttgtgaca ggctgtcttg ccagtctccc agtatgctcc 60

tcttgctctg aagtgctcca ggattgaaac cacagcttcc caaatttagcc tggaaagagt 120

gtgcggaccc agcagccttt taacccgcgt cagtgccttt gctatgttca agactgctgt 180

tttggatggtaaatgcttagc tagcactcca tcgagac atg aca gca aaa aat tct 235

Met Thr Ala Lys Asn Ser

1 5

cca aaa gaa ttt act gct tcg gaa tct gag gtt tgc ata aag act ttc 283

Pro Lys Glu Phe Thr Ala Ser Glu Ser Glu Val Cys Ile Lys Thr Phe

10 15 20

aag gag cag atg cgc ttg gaa ctt gag ctt cca aag cta cca gga aac 331

Lys Glu Gln Met Arg Leu Glu Leu Glu Leu Pro Lys Leu Pro Gly Asn

25 30 35

aga cct aca tct ccc aaa att tct cca cgc agt tca cca agg aat tca 379

Arg Pro Thr Ser Pro Lys Ile Ser Pro Arg Ser Ser Pro Arg Asn Ser

40 45 50

cca tgc ttt ttc aga aag ttg ctg gtg aat aaa agc atc cga cag cgg 427

Pro	Cys	Phe	Phe	Arg	Lys	Leu	Leu	Val	Asn	Lys	Ser	Ile	Arg	Gln	Arg	
55										65					70	
cgt cgc ttc acg gtg gct cat aca tgc ttt gat gtg gaa aat ggc cct															475	
Arg	Arg	Phe	Thr	Val	Ala	His	Thr	Cys	Phe	Asp	Val	Glu	Asn	Gly	Pro	
										80					85	
tct cca ggt cgg agc cca ctg gac cct caa gcc ggc tct tcg tcg gga															523	
Ser	Pro	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Ala	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	
										95					100	
ctg gta ctt cat gcc gcc ttt cct ggg cac agc cag cgc agg gag tcg															571	
Leu	Val	Leu	His	Ala	Ala	Phe	Pro	Gly	His	Ser	Gln	Arg	Arg	Glu	Ser	
										110					115	
ttc ctc tac gat ctt gac agc gac tat gac ttg tca cca aaa gcg atg															619	
Phe	Leu	Tyr	Asp	Leu	Asp	Ser	Asp	Tyr	Asp	Leu	Ser	Pro	Lys	Ala	Met	
										125					130	
tcc agg aac tca tca ctt ccc agt gag .caa cac ggc gat gac ctg att															667	
Ser	Arg	Asn	Ser	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	Gln	His	Gly	Asp	Asp	Leu	Ile	
										140					145	
gtc act cct ttt gcc cag gtt ctt gcc agc ttg cga agt gta aga aac															715	
Val	Thr	Pro	Phe	Ala	Gln	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Arg	Ser	Val	Arg	Asn	
										155					160	
aac ttc acc ctg ctg acg aac ctt cat gga gcg ccg aac aag agg tca															763	
Asn	Phe	Thr	Leu	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gly	Ala	Pro	Asn	Lys	Arg	Ser	
										170					175	
cca gcg gct agt cag gct cca gtc tcc aga gtc agc ctg caa gag gaa															811	
Pro	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Pro	Val	Ser	Arg	Val	Ser	Leu	Gln	Glu	Glu	
										185					190	
tca tat cag aaa cta gca atg gag acg ctg gag gaa cta gac tgg tgc															859	
Ser	Tyr	Gln	Lys	Leu	Ala	Met	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Leu	Asp	Trp	Cys	
										200					205	
ctc gac cag cta gag acc atc cag acc tac cgc tct gtc agc gag atg															907	
Leu	Asp	Gln	Leu	Glu	Thr	Ile	Gln	Thr	Tyr	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Met	
										215					220	
gtt tca aac aag ttc aaa agg atg ctg aac cgg gag ctg aca cac ctc															955	
Ala	Ser	Asn	Lys	Phe	Lys	Arg	Met	Leu	Asn	Arg	Glu	Leu	Thr	His	Leu	
										235					240	
tca gag atg agc aga tca ggg aac cag gtg tct gag tac att tca aac															1003	

Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val Ser Glu Tyr Ile Ser Asn  
 250 255 260  
  
 acg ttc tta gac aag cag aac gat gtg gaa atc cca tct ccc acg cag 1051  
 Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu Ile Pro Ser Pro Thr Gln  
 265 270 275  
  
 aag gac agg gag aag aag aag cag cag ctc atg acc cag ata agt 1099  
 Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Gln Gln Leu Met Thr Gln Ile Ser  
 280 285 290  
  
 gga gtg aag aaa ctg atg cac agc tca agc ctg aac aac aca agc atc 1147  
 Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Leu Asn Asn Thr Ser Ile  
 295 300 305 310  
  
 tca cgc ttc ggg atc aac acg gaa aat gag gat cat cta gcc aag gag 1195  
 Ser Arg Phe Gly Ile Asn Thr Glu Asn Glu Asp His Leu Ala Lys Glu  
 315 320 325  
  
 ctg gaa gac ctg aac aaa tgg ggc ctt aac atc ttc aat gtg gct ggg 1243  
 Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn Ile Phe Asn Val Ala Gly  
 330 335 340  
  
 tac tca cat aat cgg ccc ctt acg tgc atc atg tat gca ata ttc cag 1291  
 Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile Met Tyr Ala Ile Phe Gln  
 345 350 355  
  
 gaa aga gac ctt ctg aag acg ttt aaa atc tca tct gac acc ttt gta 1339  
 Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Lys Ile Ser Ser Asp Thr Phe Val  
 360 365 370  
  
 acc tac atg atg act tta gaa gac cat tac cat tct gat gtg gca tat 1387  
 Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr His Ser Asp Val Ala Tyr  
 375 380 385 390  
  
 cac aac agc ctg cat gct gct gac gtg gcc cag tca act cac gtt ctc 1435  
 His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala Gln Ser Thr His Val Leu  
 395 400 405  
  
 ctt tct acg ccg gca ctg gat gct gtc ttc aca gac ctg gaa atc ctg 1483  
 Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe Thr Asp Leu Glu Ile Leu  
 410 415 420  
  
 gct gcc att ttt gca gct gcc atc cat gat gtc gat cat cct gga gtc 1531  
 Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp Val Asp His Pro Gly Val  
 425 430 435  
  
 tcc aat cag ttt ctc atc aat aca aat tct gaa ctt gct ttg atg tat 1579

Ser	Asn	Gln	Phe	Leu	Ile	Asn	Thr	Asn	Ser	Glu	Leu	Ala	Leu	Met	Tyr	
440																
															450	
aat	gat	gaa	tct	gtt	ctg	gaa	aac	cat	cac	ctt	gct	gtg	gga	ttc	aaa	1627
Asn	Asp	Glu	Ser	Val	Leu	Glu	Asn	His	His	Leu	Ala	Val	Gly	Phe	Lys	
455																470
ttg	cta	caa	gag	gaa	cac	tgc	gac	atc	ttt	cag	aat	ctt	acc	aag	aag	1675
Leu	Leu	Gln	Glu	Glu	His	Cys	Asp	Ile	Phe	Gln	Asn	Leu	Thr	Lys	Lys	
475															485	
caa	cgc	cag	aca	ctc	agg	aaa	atg	gtg	att	gac	atg	gtg	ttg	gca	act	1723
Gln	Arg	Gln	Thr	Leu	Arg	Lys	Met	Val	Ile	Asp	Met	Val	Leu	Ala	Thr	
490															500	
gat	atg	tcc	aaa	cac	atg	agc	ctc	ctg	gca	gac	ctt	aaa	aca	atg	gta	1771
Asp	Met	Ser	Lys	His	Met	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	Lys	Thr	Met	Val	
505															515	
gaa	acc	aag	aag	gtg	aca	agc	tcc	ggt	gtt	ctc	ctc	ctg	gac	aac	tat	1819
Glu	Thr	Lys	Lys	Val	Thr	Ser	Ser	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	
520															530	
act	gac	cgg	ata	cag	gtt	ctt	cgc	aac	atg	gta	cac	tgt	gca	gac	ctg	1867
Thr	Asp	Arg	Ile	Gln	Val	Leu	Arg	Asn	Met	Val	His	Cys	Ala	Asp	Leu	
535															550	
agc	aac	ccc	acc	aag	tcc	ttg	gaa	ttg	tat	cgg	caa	tgg	acc	gat	cgt	1915
Ser	Asn	Pro	Thr	Lys	Ser	Leu	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gln	Trp	Thr	Asp	Arg	
555															565	
atc	atg	gag	gag	ttt	tcc	cag	cag	gga	gac	aaa	gaa	cgg	gag	agg	gga	1963
Ile	Met	Glu	Glu	Phe	Phe	Gln	Gln	Gly	Asp	Lys	Glu	Arg	Glu	Arg	Gly	
570															580	
atg	gag	att	agc	cca	atg	tgt	gat	aag	cac	aca	gct	tct	gtg	gaa	aaa	2011
Met	Glu	Ile	Ser	Pro	Met	Cys	Asp	Lys	His	Thr	Ala	Ser	Val	Glu	Lys	
585															595	
tcc	cag	gtt	ggt	ttc	att	gac	tac	att	gtc	cat	cca	ctg	tgg	gag	acc	2059
Ser	Gln	Val	Gly	Phe	Ile	Asp	Tyr	Ile	Val	His	Pro	Leu	Trp	Glu	Thr	
600															610	
tgg	gca	gac	ctg	gtt	caa	ccg	gat	gct	caa	gat	att	ctg	gat	aca	cta	2107
Trp	Ala	Asp	Leu	Val	Gln	Pro	Asp	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu	Asp	Thr	Leu	
615															630	
gaa	gat	aac	agg	aac	tgg	tac	cag	agt	atg	ata	ccc	cag	agc	cct	tcc	2155

Glu	Asp	Asn	Arg	Asn	Trp	Tyr	Gln	Ser	Met	Ile	Pro	Gln	Ser	Pro	Ser	
																635
																640
																645
ccg cca ctg gat gag agg agc agg gac tgc caa ggc ctg atg gag aag															2203	
Pro	Pro	Leu	Asp	Glu	Arg	Ser	Arg	Asp	Cys	Gln	Gly	Leu	Met	Glu	Lys	
																650
																655
																660
ttt cag ttt gaa ctg acc ctt gag gaa gag gat tct gag gga ccg gaa															2251	
Phe	Gln	Phe	Glu	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Glu	Asp	Ser	Glu	Gly	Pro	Glu	
																665
																670
																675
aag gag gga gaa ggc cac agc tat ttc agc agc aca aag acg ctt tgt															2299	
Lys	Glu	Gly	Glu	Gly	His	Ser	Tyr	Phe	Ser	Ser	Thr	Lys	Thr	Leu	Cys	
																680
																685
																690
gtg att gat cca gag aac agg gat tct ctg gaa gag act gac ata gac															2347	
Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Arg	Asp	Ser	Leu	Glu	Glu	Thr	Asp	Ile	Asp	
																695
																700
																705
																710
att gca aca gaa gac aag tct ccg atc gac aca taa tctctctccc															2393	
Ile	Ala	Thr	Glu	Asp	Lys	Ser	Pro	Ile	Asp	Thr						
																715
																720
tctgtgtgga gatgaacatt ccacccttga ctgagcatgc ccgctgagtg gtagggtcac															2453	
ctaccatggc caaggcctgc acaggacaaa ggccacctgg ccttccagt tacttgagtt															2513	
tggagccaga atgccaggcc gtgaagcaaa tagcagttcc atgctgtctt gccttgcctg															2573	
caagcttggc ggagacccgc agctgtatgt ggtagtagag gccagttccc atcaaagcta															2633	
aaatggcttg aaaacagagg acacaaagct gagagattgc tctgcactag gtgttggaa															2693	
gctgtcctga cagatgactg aactcactaa caacttcattc tataaatctc accacccaac															2753	
ccattgtctg ccaacctgtg tgccttttt tggaaaatgt tttcgctct ttgaaatgcc															2813	
tgttgaatat ctagagtttta gtaccaactt ctacaaactt ttttgagtct ttcttgaaaa															2873	
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa															2912	

<210> 2  
 <211> 721  
 <212> PRT  
 <213> souris

<400> 2

Met Thr Ala Lys Asn Ser Pro Lys Glu Phe Thr Ala Ser Glu Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Val Cys Ile Lys Thr Phe Lys Glu Gln Met Arg Leu Glu Leu Glu Leu  
 20 25 30  
 Pro Lys Leu Pro Gly Asn Arg Pro Thr Ser Pro Lys Ile Ser Pro Arg  
 35 40 45  
 Ser Ser Pro Arg Asn Ser Pro Cys Phe Phe Arg Lys Leu Leu Val Asn  
 50 55 60  
 Lys Ser Ile Arg Gln Arg Arg Arg Phe Thr Val Ala His Thr Cys Phe  
 65 70 75 80  
 Asp Val Glu Asn Gly Pro Ser Pro Gly Arg Ser Pro Leu Asp Pro Gln  
 85 90 95  
 Ala Gly Ser Ser Ser Gly Leu Val Leu His Ala Ala Phe Pro Gly His  
 100 105 110  
 Ser Gln Arg Arg Glu Ser Phe Leu Tyr Asp Leu Asp Ser Asp Tyr Asp  
 115 120 125  
 Leu Ser Pro Lys Ala Met Ser Arg Asn Ser Ser Leu Pro Ser Glu Gln  
 130 135 140  
 His Gly Asp Asp Leu Ile Val Thr Pro Phe Ala Gln Val Leu Ala Ser  
 145 150 155 160  
 Leu Arg Ser Val Arg Asn Asn Phe Thr Leu Leu Thr Asn Leu His Gly  
 165 170 175  
 Ala Pro Asn Lys Arg Ser Pro Ala Ala Ser Gln Ala Pro Val Ser Arg  
 180 185 190  
 Val Ser Leu Gln Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu  
 195 200 205  
 Glu Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr  
 210 215 220  
 Arg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Arg Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val  
 245 250 255  
 Ser Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu  
 260 265 270  
 Ile Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Gln Gln  
 275 280 285  
 Leu Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser  
 290 295 300  
 Leu Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Ile Asn Thr Glu Asn Glu  
 305 310 315 320  
 Asp His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn  
 325 330 335  
 Ile Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile  
 340 345 350  
 Met Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Lys Ile  
 355 360 365  
 Ser Ser Asp Thr Phe Val Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr  
 370 375 380

His Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala  
 385 390 395 400  
 Gln Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe  
 405 410 415  
 Thr Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp  
 420 425 430  
 Val Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser  
 435 440 445  
 Glu Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His  
 450 455 460  
 Leu Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe  
 465 470 475 480  
 Gln Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile  
 485 490 495  
 Asp Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala  
 500 505 510  
 Asp Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val  
 515 520 525  
 Leu Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met  
 530 535 540  
 Val His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr  
 545 550 555 560  
 Arg Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp  
 565 570 575  
 Lys Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His  
 580 585 590  
 Thr Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val  
 595 600 605  
 His Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln  
 610 615 620  
 Asp Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met  
 625 630 635 640  
 Ile Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Arg Ser Arg Asp Cys  
 645 650 655  
 Gln Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Glu Glu Glu  
 660 665 670  
 Asp Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser  
 675 680 685  
 Ser Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu  
 690 695 700  
 Glu Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Ile Asp  
 705 710 715 720  
 Thr

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (766) .. (2460)

&lt;223&gt; PDE4B

&lt;400&gt; 3

gaattcctcc tctcttcacc ccgttagctg ttttcaatgt aatgctgccg tccttcttt 60

gcactgcctt ctgcgctaac acctccattc ctgtttataa ccgtgtattt attacttaat 120

gtatataatg taatgttttg taagtttatta atttatataat ctaacattgc ctgccaatgg 180

tggtgttaaa tttgtgtaga aaactctgcc taagagttac gacttttct tggtaatgttt 240

tgtattgtgt attatataac ccaaacgtca ctttagtagag acatatggcc cccttggcag 300

agaggacagg ggtgggcttt tgttcaaagg gtctgcctt tccctgcctg agttgctact 360

tctgcacaac ccctttatga accagtttc acccgaaattt tgactgtttc atttagaaga 420

aaagcaaaat gagaaaaaagc tttcctcatt ttccttgag atggcaaagc actcagaaat 480

gacatcacat accctaaaga accctgggat gactaaggca gagagagtct gagaaaaactc 540

tttggtgatt ctgccttag ttttaggaca cattatgca gatgagctta taagagacgg 600

ttccctccgc cttcttcctc agaggaagtt tcttggtaga tcaccgacac ctcatccagg 660

cggggggttg gggggaaact tggcaccagc catcccagggc agagcaccac tggatgtt 720

tctcctggtg gagagagctg gaaggaagga gccagcgtgc aaata atg aag gag cac 777

Met Lys Glu His

1

ggg ggc acc ttc agt agc acc gga atc agc ggt ggt agc ggt gac tct 825  
Gly Gly Thr Phe Ser Ser Thr Gly Ile Ser Gly Gly Ser Gly Asp Ser

5

10

15

20

gct atg gac agc ctg cag ccg ctc cag cct aac tac atg cct gtg tgt 873  
Ala Met Asp Ser Leu Gln Pro Leu Gln Pro Asn Tyr Met Pro Val Cys

25

30

35

ttg ttt gca gaa gaa tct tat caa aaa tta gca atg gaa acg ctg gag 921  
Leu Phe Ala Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu Glu

40

45

50

gaa tta gac tgg tgt tta gac cag cta gag acc ata cag acc tac cgg	55	60	65	969
Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr Arg				
tct gtc agt gag atg gct tct aac aag ttc aaa aga atg ctg aac cgg	70	75	80	1017
Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn Arg				
gag ctg aca cac ctc tca gag atg agc cga tca ggg aac cag gtg tct	85	90	95	1065
Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val Ser				
gaa tac att tca aat act ttc tta gac aag cag aat gat gtg gag atc	105	110	115	1113
Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu Ile				
cca tct cct acc cag aaa gac agg gag aaa aag aaa aag cag cag ctc	120	125	130	1161
Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Gln Gln Leu				
atg acc cag ata agt gga gtg aag aaa tta atg cat agt tca agc cta	135	140	145	1209
Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser Leu				
aac aat aca agc atc tca cgc ttt gga gtc aac act gaa aat gaa gat	150	155	160	1257
Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Val Asn Thr Glu Asn Glu Asp				
cac ctg gcc aag gag ctg gaa gac ctg aac aaa tgg ggt ctt aac atc	165	170	175	1305
His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn Ile				
ttt aat gtg gct gga tat tct cac aat aga ccc cta aca tgc atc atg	185	190	195	1353
Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile Met				
tat gct ata ttc cag gaa aga gac ctc cta aag aca ttc aga atc tca	200	205	210	1401
Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Arg Ile Ser				
tct gac aca ttt ata acc tac atg atg act tta gaa gac cat tac cat	215	220	225	1449
Ser Asp Thr Phe Ile Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr His				
tct gac gtg gca tat cac aac agc ctg cac gct gct gat gta gcc cag	230	235	240	1497
Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala Gln				

tcg acc cat gtt ctc ctt tct aca cca gca tta gac gct gtc ttc aca	245	250	255	260	1545
Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe Thr					
gat ttg gag atc ctg gct gcc att ttt gca gct gcc atc cat gac gtt	265	270	275		1593
Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp Val					
gat cat cct gga gtc tcc aat cag ttt ctc atc aac aca aat tca gaa	280	285	290		1641
Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser Glu					
ctt gct ttg atg tat aat gat gaa tct gtg ttg gaa aat cat cac ctt	295	300	305		1689
Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His Leu					
gct gtg ggt ttc aaa ctg ctg caa gaa gaa cac tgt gac atc ttc atg	310	315	320		1737
Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe Met					
aat ctc acc aag aag cag cgt cag aca ctc agg aag atg gtt att gac	325	330	335	340	1785
Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile Asp					
atg gtg tta gca act gat atg tct aaa cat atg agc ctg ctg gca gac	345	350	355		1833
Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala Asp					
ctg aag aca atg gta gaa acg aag aaa gtt aca agt tca ggc gtt ctt	360	365	370		1881
Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val Leu					
ctc cta gac aac tat acc gat cgc att cag gtc ctt cgc aac atg gta	375	380	385		1929
Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met Val					
cac tgt gca gac ctg agc aac ccc acc aag tcc ttg gaa ttg tat cgg	390	395	400		1977
His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr Arg					
caa tgg aca gac cgc atc atg gag gaa ttt ttc cag cag gga gac aaa	405	410	415	420	2025
Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp Lys					
gag cgg gag agg gga atg gaa att agc cca atg tgt gat aaa cac aca	425	430	435		2073
Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His Thr					

gct tct gtg gaa aaa tcc cag gtt ggt ttc atc gac tac att gtc cat 2121  
 Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val His  
 440 445 450

cca ttg tgg gag aca tgg gca gat ttg gta cag cct gat gct cag gac 2169  
 Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln Asp  
 455 460 465

att ctc gat acc tta gaa gat aac agg aac tgg tat cag agc atg ata 2217  
 Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met Ile  
 470 475 480

cct caa agt ccc tca cca cca ctg gac gag cag aac agg gac tgc cag 2265  
 Pro Gln Ser Pro Ser Pro Leu Asp Glu Gln Asn Arg Asp Cys Gln  
 485 490 495 500

ggt ctg atg gag aag ttt cag ttt gaa ctg act ctc gat gag gaa gat 2313  
 Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Asp Glu Glu Asp  
 505 510 515

tct gaa gga cct gag aag gag gga gag gga cac agc tat ttc agc agc 2361  
 Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu His Ser Tyr Phe Ser Ser  
 520 525 530

aca aag acg ctt tgt gtg att gat cca gaa aac aga gat tcc ctg gga 2409  
 Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu Gly  
 535 540 545

gag act gac ata gac att gca aca gaa gac aag tcc ccc gtg gat aca 2457  
 Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Val Asp Thr  
 550 555 560

taa tccccctctc cctgtggaga tgaacattct atccttgatg agcatgccag 2510  
 565

ctatgtggta gggccagccc accatgggggg ccaagacctg cacaggacaa gggccacctg 2570

gcctttcagt tacttgagtt tggagtcaga aagcaagacc aggaagcaaa tagcagctca 2630

ggaaatccca cggttgactt gccttgatgg caagcttggt ggagagggct gaagctgttg 2690

ctggggggccg attctgatca agacacatgg cttgaaaatg gaagacacaa aactgagaga 2750

tcattctgca ctaagttcg ggaacttac cccgacagtg actgaactca ctgactaata 2810

acttcattta tgaatcttct cacttgtccc tttgtctgcc aacctgtgtg cctttttgt 2870

aaaacatttt catgtcttta aaatgcctgt tgaatacctg gagtttagta tcaacttcta 2930  
cacagataag ctttcaaagt tgacaaaactt ttttgactct ttctggaaaa gggaaagaaaa 2990  
atagtcttcc ttctttcttg ggcaatatcc ttcactttac tacagttact tttgcaaaca 3050  
gacagaaagg atacacttct aaccacattt tacttccttc ccctgttgc cagtccaaact 3110  
ccacagtcac tcttaaaact tctctctgtt tgccctgcctc caacagtact tttaactttt 3170  
tgctgtaaac agaataaaaat tgaacaaatt agggggtaga aaggagcagt ggtgtcggtc 3230  
accgtgagag tctgcataga actcagcagt gtgcctgct gtgtcttggc ccctgcccc 3290  
cacaggagtt gctacagtcc ctggccctgc ttcccatcct cctctttca ccccgtagc 3350  
tgttttcaat gtaatgctgc cgtccttc ttcactgccc ttctgcgcta acacctccat 3410  
tcctgttat aaccgtgtat ttattactta atgtatataa tgtaatgttt tgtaagttat 3470  
taatttatat atctaacatt gcctgccaat ggtgggttta aatttgtgtta gaaaactctg 3530  
cctaagagtt acgactttt cttgtaatgt tttgtattgt gtattatata acccaaacgt 3590  
cacttagtag agacatatgg ccccccttggc agagaggaca ggggtgggct tttgttcaaa 3650  
gggtctgccc ttccctgccc tgagttgcta cttctgcaca accccctttat gaaccagtt 3710  
tggaaacaat attctcacat tagatactaa atggtttata ctgagtcttt tactttgta 3770  
tagttgata gggcagggg caatggatg tagttttac ccaggttcta tccaaatcta 3830  
tgtgggcattt agttgggtta taactggatc ctactatcat tgtggctttg gttcaaaagg 3890  
aaacactaca tttgctcaca gatgattctt ctgatttttc tgaatgctcc cgaactactg 3950  
actttgaaga ggtgcctcc tgcctgccc taagcagggaa tgtcatgttc cagttcatta 4010  
caaaaagaaaa caataaaaca atgtgaattt ttataataaa aaaaaaaaaa aggaattc 4068

<210> 4  
<211> 564  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Glu His Gly Gly Thr Phe Ser Ser Thr Gly Ile Ser Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Gly Asp Ser Ala Met Asp Ser Leu Gln Pro Leu Gln Pro Asn Tyr  
 20 25 30  
 Met Pro Val Cys Leu Phe Ala Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met  
 35 40 45  
 Glu Thr Leu Glu Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile  
 50 55 60  
 Gln Thr Tyr Arg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg  
 65 70 75 80  
 Met Leu Asn Arg Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly  
 85 90 95  
 Asn Gln Val Ser Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn  
 100 105 110  
 Asp Val Glu Ile Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys  
 115 120 125  
 Lys Gln Gln Leu Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His  
 130 135 140  
 Ser Ser Ser Leu Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Val Asn Thr  
 145 150 155 160  
 Glu Asn Glu Asp His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp  
 165 170 175  
 Gly Leu Asn Ile Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu  
 180 185 190  
 Thr Cys Ile Met Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr  
 195 200 205  
 Phe Arg Ile Ser Ser Asp Thr Phe Ile Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu  
 210 215 220  
 Asp His Tyr His Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala  
 225 230 235 240  
 Asp Val Ala Gln Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp  
 245 250 255  
 Ala Val Phe Thr Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala  
 260 265 270  
 Ile His Asp Val Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn  
 275 280 285  
 Thr Asn Ser Glu Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu  
 290 295 300  
 Asn His His Leu Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys  
 305 310 315 320  
 Asp Ile Phe Met Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys  
 325 330 335  
 Met Val Ile Asp Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser  
 340 345 350  
 Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser  
 355 360 365  
 Ser Gly Val Leu Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu  
 370 375 380

Arg Asn Met Val His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Glu Leu Tyr Arg Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln  
 405 410 415  
 Gln Gly Asp Lys Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys  
 420 425 430  
 Asp Lys His Thr Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp  
 435 440 445  
 Tyr Ile Val His Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro  
 450 455 460  
 Asp Ala Gln Asp Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr  
 465 470 475 480  
 Gln Ser Met Ile Pro Gln Ser Pro Ser Pro Leu Asp Glu Gln Asn  
 485 490 495  
 Arg Asp Cys Gln Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu  
 500 505 510  
 Asp Glu Glu Asp Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser  
 515 520 525  
 Tyr Phe Ser Ser Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg  
 530 535 540  
 Asp Ser Leu Gly Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser  
 545 550 555 560  
 Pro Val Asp Thr

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 5

gccaggccgt gaagcaaata

20

<210> 6

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 6

tcaaagacgc gaaaacat

18

<210> 7  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 7  
ccgcgtcagt gcctttgcta t

21

<210> 8  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 8  
cgctgtcgga tgcttttatt cac

23

<210> 9  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 9  
tcgccttctg gaggggtgtc

19

<210> 10  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 10  
ccgcaggggc agcagtgg

18

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle**  
Bureau international



**(43) Date de la publication internationale**  
27 février 2003 (27.02.2003)

**PCT**

**(10) Numéro de publication internationale**  
**WO 2003/016563 A3**

**(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12Q 1/68, C12N 9/16**

**(21) Numéro de la demande internationale :**  
PCT/FR2002/002861

**(22) Date de dépôt international :** 13 août 2002 (13.08.2002)

**(25) Langue de dépôt :** français

**(26) Langue de publication :** français

**(30) Données relatives à la priorité :**  
01/10819 14 août 2001 (14.08.2001) FR

**(63) Apparenté(e) par continuation (CON) ou par continuation partielle (CIP) à une demande antérieure :**  
US 09/983,754 (CIP)  
Déposée le Non communiquée

**(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : EX-ONHIT THERAPEUTICS SA [FR/FR]; 26, rue Brunel, F-75017 Paris (FR).**

**(72) Inventeurs; et**  
**(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : AÏT IKHLEF, Ali [FR/FR]; 1, rue de l'Eglise, 91940 Gometz Le Châtel (FR). RESINK, Annelies [NL/FR]; 48, rue Bobillot, F-75013 Paris (FR). SCHWEIGHOFFER, Fabien [FR/FR]; 38, avenue Paul Déroulède, F-94300 Vincennes (FR).**

**(74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Cabinet Becker et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).**

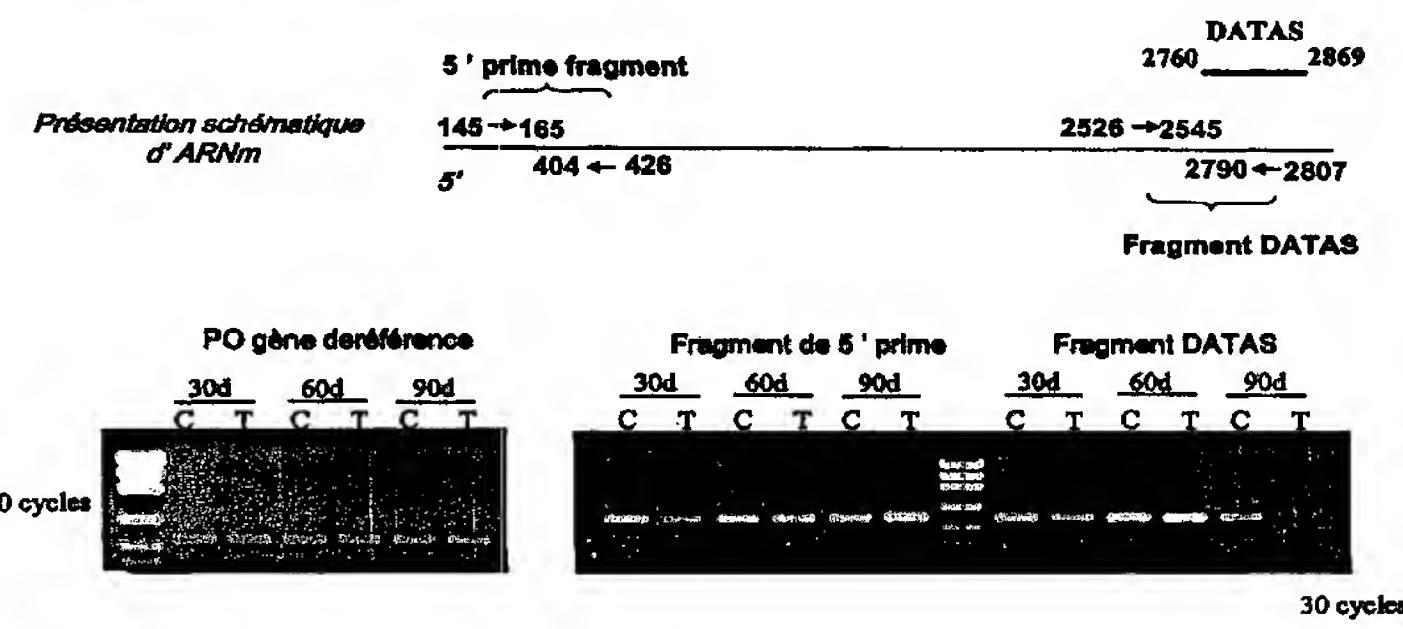
**(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,**

*[Suite sur la page suivante]*

**(54) Title: NOVEL MOLECULAR TARGET FOR NEUROTOXICITY**

**(54) Titre : CIBLE MOLECULAIRE DE LA NEUROTOXICITE**

**Analyse d'expression d'Isoforme de PDE4B dans le cerveau par  
PCR semi-quantitative**



**A**

ANALYSE...:-ANALYSIS OF EXPRESSION OF PDE4B ISOFORMS IN THE  
BRAIN BY SEMI-QUANTITATIVE PCR  
PRÉSENTATION SCHÉMATIQUE...:- SCHEMATIC ARNm REPRESENTATION  
PO GÉNE...:- PO REFERENCE GENE  
FRAGMENT DE 5' PRIME:- 5' PRIME FRAGMENT  
FRAGMENT DATAS:- DATAS FRAGMENT  
RESTE IDEM

**(57) Abstract:** The invention relates to the field of biology, genetics and medicine and to novel methods of detecting, characterising and/or treating (or managing) neurodegenerative pathologies, particularly amyotrophic lateral sclerosis. Said invention also relates to methods of identifying or screening active compounds in said pathologies. Moreover, the invention relates to compounds, genes, cells, plasmids or compositions that can be used to carry out the above-mentioned methods. In particular, the invention outlines the role of PDE4B in said pathologies and the use thereof as a therapeutic, diagnostic or experimental target.

*[Suite sur la page suivante]*

**WO 2003/016563 A3**



SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés (regional)** : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

**Publiée :**

— *avec rapport de recherche internationale*

(88) **Date de publication du rapport de recherche internationale:**

1 avril 2004

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

---

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en oeuvre des méthodes ci-dessus. L'invention décrit notamment le rôle de PDE4B dans ces pathologies et son utilisation comme cible thérapeutique, diagnostique ou expérimentale.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12Q1/68 C12N9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, EPO-Internal, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHERRY J A ET AL: "Diazepam and rolipram differentially inhibit cyclic AMP-specific phosphodiesterases PDE4A1 and PDE4B3 in the mouse" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1518, no. 1-2, 19 March 2001 (2001-03-19), pages 27-35, XP004275852 ISSN: 0167-4781 page 27 -page 28, left-hand column; figures 1,3,4; table 1 &amp; DATABASE EMBL 'Online' ebi; 23 December 1999 (1999-12-23) XP002248838 abstract</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,6,8,17

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- °A° document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- °E° earlier document but published on or after the International filing date
- °L° document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- °O° document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- °P° document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- °T° later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- °X° document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- °Y° document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- °&° document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 July 2003

Date of mailing of the International search report

31/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/FR 02/02861

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 977 305 A (COLICELLI JOHN J ET AL) 2 November 1999 (1999-11-02) SEQ ID N0s: 23,24 & 58 column 3, line 41 -column 6, line 3 column 7, line 40 -column 9, line 35 column 10, line 38 -column 11, line 21 examples 5,11 ---	1-6,8, 18,19
X	WO 00 40714 A (ARROW AMY ;OLIGOS ETC INC (US); THOMPSON TERRY (US); DALE RODERIC) 13 July 2000 (2000-07-13) page 1, line 1 -page 4, line 25; claims 1-11 ---	6-8
X	MISHRA S K ET AL: "CALCIUM CALMODULIN AND 3' 5' CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE ACTIVITY IN HUMAN MUSCULAR DISORDERS" JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES, vol. 109, no. 2, June 1992 (1992-06), pages 215-218, XP001064869 ISSN: 0022-510X abstract; table 1 ---	1
A	US 5 851 784 A (PERRY MARTIN JOHN ET AL) 22 December 1998 (1998-12-22) column 1, line 16 -column 6, line 13 ---	1-19
A	WO 01 44449 A (UNIV UTAH RES FOUND ;BOLGER GRAEME (US)) 21 June 2001 (2001-06-21) SEQ ID NO: 11 page 7, line 7 -page 8, line 24; claims 1-18; example 1 ---	1-19
A	US 6 060 501 A (GRAF HERMANN ET AL) 9 May 2000 (2000-05-09) column 4, line 29 - line 65 ---	1-19
A	PRICE D L ET AL: "AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS AND ALZHEIMER'S DISEASE LESSONS FROM MODEL SYSTEMS" REVUE NEUROLOGIQUE, MASSON, PARIS, FR, vol. 153, no. 8/9, September 1997 (1997-09), pages 484-495, XP000982876 ISSN: 0035-3787 abstract page 486 -page 488, left-hand column -----	1-19

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Internat Application No

PCT/FR 02/02861

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 5977305	A	02-11-1999	US	6100025 A	08-08-2000
			US	5527896 A	18-06-1996
			US	6080540 A	27-06-2000
			US	6069240 A	30-05-2000
			AT	204603 T	15-09-2001
			CA	2080920 A1	21-10-1991
			DE	69132701 D1	27-09-2001
			DE	69132701 T2	20-06-2002
			DK	666314 T3	10-12-2001
			EP	0537173 A1	21-04-1993
			EP	0666314 A1	09-08-1995
			EP	0940469 A2	08-09-1999
			ES	2165397 T3	16-03-2002
			HK	1013314 A1	10-05-2002
			JP	11253200 A	21-09-1999
			JP	3258635 B2	18-02-2002
			JP	11239481 A	07-09-1999
			JP	5507196 T	21-10-1993
			WO	9116457 A1	31-10-1991
			US	6569617 B1	27-05-2003
-----					
WO 0040714	A	13-07-2000	AU	2480800 A	24-07-2000
			CA	2357950 A1	13-07-2000
			EP	1141278 A2	10-10-2001
			JP	2002534086 T	15-10-2002
			US	2003045490 A1	06-03-2003
			WO	0040714 A2	13-07-2000
-----					
US 5851784	A	22-12-1998	AU	4270596 A	19-07-1996
			CA	2182946 A1	04-07-1996
			EP	0746619 A1	11-12-1996
			WO	9620281 A1	04-07-1996
			GB	2301363 A ,B	04-12-1996
			JP	9509851 T	07-10-1997
			US	6291199 B1	18-09-2001
-----					
WO 0144449	A	21-06-2001	AU	2433001 A	25-06-2001
			WO	0144449 A1	21-06-2001
-----					
US 6060501	A	09-05-2000	AU	699085 B2	19-11-1998
			AU	2266295 A	16-11-1995
			CA	2188269 A1	02-11-1995
			EP	0758233 A1	19-02-1997
			WO	9528926 A1	02-11-1995
			JP	2001508020 T	19-06-2001
-----					

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

PCT/FR 02/02861

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12Q1/68 C12N9/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, Sequence Search, MEDLINE, EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CHERRY J A ET AL: "Diazepam and rolipram differentially inhibit cyclic AMP-specific phosphodiesterases PDE4A1 and PDE4B3 in the mouse"  <i>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION</i>, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1518, no. 1-2, 19 mars 2001 (2001-03-19), pages 27-35, XP004275852  ISSN: 0167-4781  page 27 - page 28, colonne de gauche;  figures 1,3,4; tableau 1  &amp; DATABASE EMBL  ebi; 23 décembre 1999 (1999-12-23), XP002248838  abrégé</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1,6,8,17

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achovée

14 janvier 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31 07 2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

van Klompenburg, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

PCT/FR 02/02861

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 977 305 A (COLICELLI JOHN J ET AL) 2 novembre 1999 (1999-11-02) SEQ ID NOS: 23,24 & 58 colonne 3, ligne 41 - colonne 6, ligne 3 colonne 7, ligne 40 - colonne 9, ligne 35 colonne 10, ligne 38 - colonne 11, ligne 21 exemples 5,11 -----	1-6,8, 18,19
X	WO 00/40714 A (ARROW AMY ; OLIGOS ETC INC (US); THOMPSON TERRY (US); DALE RODERIC) 13 juillet 2000 (2000-07-13) page 1, ligne 1 - page 4, ligne 25; revendications 1-11 -----	6-8
X	MISHRA S K ET AL: "CALCIUM CALMODULIN AND 3' 5' CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE ACTIVITY IN HUMAN MUSCULAR DISORDERS" JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES, vol. 109, no. 2, juin 1992 (1992-06), pages 215-218, XP001064869 ISSN: 0022-510X abrégé; tableau 1 -----	1
A	US 5 851 784 A (PERRY MARTIN JOHN ET AL) 22 décembre 1998 (1998-12-22) colonne 1, ligne 16 - colonne 6, ligne 13 -----	1-19
A	WO 01/044449 A (UNIV UTAH RES FOUND ; BOLGER GRAEME (US)) 21 juin 2001 (2001-06-21) SEQ ID NO: 11 page 7, ligne 7 - page 8, ligne 24; revendications 1-18; exemple 1 -----	1-19
A	US 6 060 501 A (GRAF HERMANN ET AL) 9 mai 2000 (2000-05-09) colonne 4, ligne 29 - ligne 65 -----	1-19
A	PRICE D L ET AL: "AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS AND ALZHEIMER'S DISEASE LESSONS FROM MODEL SYSTEMS" REVUE NEUROLOGIQUE, MASSON, PARIS, FR, vol. 153, no. 8/9, septembre 1997 (1997-09), pages 484-495, XP000982876 ISSN: 0035-3787 abrégé page 486 - page 488, colonne de gauche -----	1-19

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 02/02861

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5977305	A	02-11-1999	US 6100025 A US 5527896 A US 6080540 A US 6069240 A AT 204603 T CA 2080920 A1 DE 69132701 D1 DE 69132701 T2 DK 666314 T3 EP 0537173 A1 EP 0666314 A1 EP 0940469 A2 ES 2165397 T3 HK 1013314 A1 JP 11253200 A JP 3258635 B2 JP 11239481 A JP 5507196 T WO 9116457 A1 US 6569617 B1	08-08-2000 18-06-1996 27-06-2000 30-05-2000 15-09-2001 21-10-1991 27-09-2001 20-06-2002 10-12-2001 21-04-1993 09-08-1995 08-09-1999 16-03-2002 10-05-2002 21-09-1999 18-02-2002 07-09-1999 21-10-1993 31-10-1991 27-05-2003
-----				
WO 0040714	A	13-07-2000	AU 2480800 A CA 2357950 A1 EP 1141278 A2 JP 2002534086 T US 2003045490 A1 WO 0040714 A2	24-07-2000 13-07-2000 10-10-2001 15-10-2002 06-03-2003 13-07-2000
-----				
US 5851784	A	22-12-1998	AU 4270596 A CA 2182946 A1 EP 0746619 A1 WO 9620281 A1 GB 2301363 A ,B JP 9509851 T US 6291199 B1	19-07-1996 04-07-1996 11-12-1996 04-07-1996 04-12-1996 07-10-1997 18-09-2001
-----				
WO 0144449	A	21-06-2001	AU 2433001 A WO 0144449 A1	25-06-2001 21-06-2001
-----				
US 6060501	A	09-05-2000	AT 255413 T AU 699085 B2 AU 2266295 A CA 2188269 A1 DE 69532238 D1 EP 1380291 A1 EP 0758233 A1 WO 9528926 A1 JP 2001508020 T	15-12-2003 19-11-1998 16-11-1995 02-11-1995 15-01-2004 14-01-2004 19-02-1997 02-11-1995 19-06-2001
-----				